

Joaquín Marco Brualla

# Metabolismo glucídico de los tumores y distintas aproximaciones de terapia antitumoral

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es  
Anel Bernal, Luis Alberto  
Moreno Loshuertos, Raquel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**METABOLISMO GLUCÍDICO DE LOS TUMORES Y  
DISTINTAS APROXIMACIONES DE TERAPIA  
ANTITUMORAL**

Autor

**Joaquín Marco Brualla**

Director/es

Anel Bernal, Luis Alberto  
Moreno Loshuertos, Raquel

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2019







**Universidad**  
**Zaragoza**



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis Doctoral

# METABOLISMO GLUCÍDICO DE LOS TUMORES Y DISTINTAS APROXIMACIONES DE TERAPIA ANTITUMORAL

Memoria presentada por

**Joaquín Marco Brualla**

Licenciado en Bioquímica

Para optar al grado de Doctor en Ciencias

en la Universidad de Zaragoza

Julio 2019



Bueno, pues por fin estamos aquí. Parece que fue ayer cuando arranqué mis andaduras con el Doctorado, sin saber muy bien dónde me metía (¿y quién lo sabe?). Parecía que quedaba muy lejos el momento en el que me tocara presentar la Tesis. Pero los días pasan sin que te des cuenta y, de repente, eres tú quien tiene que escribirla. Seis años en el Laboratorio dan para muchas experiencias, he conocido a mucha gente y he recibido la ayuda de otras tantas a quienes quiero agradecer.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de la Tesis: **Alberto y Raquel**. Durante todas las etapas de la Tesis me habéis ayudado y preocupado por mi presente y mi futuro. Sin vosotros ni me habría ido de estancia, ni habría cobrado de un contrato digno (si tengo que seguir esperando a la DGA, mal vamos), ni habría sabido hacer ni la mitad de los experimentos. Confiasteis en mí este proyecto y os lo agradezco. No se me ocurren mejores tutores para un doctorando.

También quisiera agradecer al resto de jefes del grupo de ~~Apoptosis~~ Inmunidad, Cáncer y Células Madre: a **Javier e Isabel**, por vuestra ayuda y consejos en los *Lab Meetings*, así como fuera de ellos; y a **María Ángeles, Fermín y María** por vuestro interés. Tampoco quisiera olvidarme de **Luis**, por tus ideas para los experimentos, tu ayuda con las histologías y tu seguimiento de mi trabajo; y de la *parte mitocondrial*: a **Patricio, Nuria y Pilar**, por recibirme con amabilidad en vuestro laboratorio y ayudarme cuando lo necesité (“¿Ha venido hoy Raquel?”).

La verdad es que cuando entré al Laboratorio durante el TAD (para los *bolonios*, el TFG), hace ya más de 5 años, era un pipiolo e iba increíblemente perdido con lo que tenía que hacer, el cómo y el porqué. Menos mal que tuve la suerte de conocer al *Grupo de Veteranos*, que me echaron una mano en todo. A **Diegón**, el Dios del LUV-TRAIL, científico entre científicos. Tu pasión por la Ciencia es contagiosa, pero las risas con tus bromas más aún. Tus consejos metodológicos y los apodos con los que me bautizaste aún me persiguen a día de hoy. A **Natalia**, por todas tus historietas y por las risas que siempre inundaban el laboratorio. Cómo se nota el hueco que dejaste cuando te fuiste, ¡te echamos de menos Nat, vuelve a comer un día! A **Lou**, por tu amabilidad, tu predisposición siempre a escuchar y, cómo no, por tus consejos con el *Word*, me han salvado la vida. A **Rubén**, siempre de buen rollo y dispuesto a hacer bromas y mejorar el ambiente en el laboratorio. A **Oscar**, por preocuparte de toda la gente que te rodea y tener un consejo para todo el mundo. Aunque tus intentos de ir de duro no engañaban a nadie, sé que intentabas meterme caña por mi bien, así que te lo agradezco. A **Vidal y a Paula**, los compañeros perfectos para los *Escape Rooms*, gracias por ser siempre tan simpáticos conmigo y por vuestra amistad. La camaradería de Vidal y el optimismo de Paula me han apoyado mucho. Vuestras vueltas a Zaragoza son siempre un buen motivo para quedar. Sí, tenemos que volver a Madrid a

visitaros. También quiero dar las gracias a **David (DVD)** y **Sameer** que, aunque no os llegué a conocer mucho, me ayudasteis cada vez que lo necesité. Se os echa mucho de menos gente.

De los mejores recuerdos que me llevé de mis andaduras por Montpellier fue la gente que conocí allí. Primero querría mencionar a **Martín**, gracias por acogerme en tu grupo y por revisar con cuidado el trabajo que estuve desarrollando allí. Tampoco me puedo olvidar de **Nerea** y de **Diego S**, siempre me echasteis una mano, me disteis buenos consejos y, sobre todo, hicisteis que la estancia dentro y fuera del laboratorio fuera muy agradable. Aún echo de menos los cafés de las 10. También agradezco al resto de la gente del laboratorio: **Abrar, Dang, Javier, Gabriel...** por vuestra amabilidad y consejos en las reuniones. Espero que os vaya bien allá donde estéis. Y a la gente de la residencia, aunque no vayáis a leer esto: **Alicia, Marie Laure, Marc-Antoine, Manuarii, Teddy, Rachel, Christine, etc...** gracias por vuestra amistad el tiempo que estuve allí.

Ya de vuelta en Zaragoza, he conocido a tanta gente que me ha ayudado que casi no sé ni por dónde empezar...

Hace ya como 5 años que os marchasteis al CIBA, pero vuestra ausencia se sigue notando en el labo. A **Pilar**, por todos tus consejos científicos y por conseguir que un tronco sin ritmo aprenda a bailar. Se nota que vales para esto y seguro que llegarás lejos (y en la Ciencia también). A **Laura**, o *rubiloki*, por tu locura tan espontánea que tantas risas ha dado al laboratorio. ¡A ver si te paseas más veces por el citómetro! A **Iratxe**, por compartir frikismos y por ser de las pocas personas con las que puedo compartir memes extraños, entenderlos y reírnos de ellos. Por último, a **Llipsy, Maykel y Julián**, por vuestro interés en los Lab Meetings.

En estos años, ha pasado mucha gente por el laboratorio de *Animales*, que de una forma u otra me han apoyado. Quiero empezar con las personas que he tenido la oportunidad de enseñar: a **María**, a **Deisy**, a **Ruth** y a **Judit**. Da gusto poder compartir tiempo con personas tan simpáticas y que muestran tanto interés por sus trabajos. Diría que he aprendido más de vosotras que vosotras de mí. Os deseo mucha suerte en lo que os queda por venir.

Para seguir, a toda la tropa del laboratorio, empezamos: a **Ana**. Entramos en el laboratorio en el mismo curso, increíble cómo han pasado estos 5 años. Poder compartir consejos y recibirlos por tu parte ha sido de lo mejor que me ha dado el laboratorio. Por no hablar de tu sabiduría esotérica, de **Lenita**, de las barbacoas... Gracias por toda tu ayuda durante todo este tiempo. Siento que nos une una gran amistad y confío mucho en ti. A **Chantal**: parece increíble que "sólo" lleves dos cursos por aquí, tu optimismo, iniciativa y tus ganas de hacer planes le han dado otro color al laboratorio. Siempre estás preocupándote de las personas que te rodean y se nota. Poder compartir tantos gustos similares contigo es un regalo. Pero a la próxima invito yo. A

**Paula G:** si me dieran un euro cada vez que he oído la frase “¿Habéis avisado a Paula?” no necesitaría contrato. Me alegro mucho de que te hayas integrado en nuestro grupo, tu sencillez para hacer las cosas es un ejemplo para todos. ¡A ver si vamos a verte de nuevo al rugby! A **David:** la definición gráfica de un Ravenclaw. Tu facilidad para entender y explicar las cosas es asombrosa. Voy a echar de menos todas las discusiones *frikis* sobre sagas de películas y series. Y por supuesto las partidas de guiñote. ¡Labrador tonto, patatas gordas! A **Alba:** sólo estuviste un año por aquí pero no hicieron más para demostrar la gran persona que eres. Gracias por los momentos que hemos compartido, aunque te metas conmigo, y por el protector anti-suciedad. Confía en ti misma y llegarás hasta donde tú quieras, no te rindas. A **Nelly,** la informática del grupo. Tu carácter afable y tus ganas de hablar y escuchar a la gente hace que todo sea más fácil en el laboratorio. Eso y que te guste el Rock. A **Manu,** el cantante del grupo. Siempre estás dispuesto a echar una mano en cualquier cosa que haga falta. Gracias por recoger el testigo de las aguas...de forma no voluntaria (perdón). A **Andrea:** la madrugadora del grupo. Muchas gracias por tu amabilidad durante estos años. Has conseguido de alguna forma que soporte la Cadena Dial, lo cual de alguna forma supongo que es mejor que aguantar la Máxima FM. Eres más que bienvenida en cultivos abajo. A **Raquel y Patricia,** el pack granulisino. Gracias, Raquel, por ayudarme con los experimentos que lo necesité y por esas visitas al Bifi, y gracias, Patricia, por tu sentido del humor, creo que eres la única persona en este mundo que puede contar el chiste “*De-mente*” y resultar gracioso. A **Alfonso:** eres una de las personas más trabajadoras que conozco, se nota que sabes de lo que hablas en la Ciencia. Gracias por tus consejos y por los Huesitos. Tampoco me puedo olvidar de **Leo,** calmada de día, desatada de noche. ¡Qué grandes momentos nos has dado! A ver si volvemos a ver a tus reses y a Sopas algún día. Por último, de la parte mitocondrial, tampoco me voy a dejar a **Javier** y a **Soraya,** habéis llegado hace poco, pero se nota que sois buena gente. Mucho ánimo con vuestras tesis, ya veréis como os va genial.

Por supuesto, también quiero mencionar a los técnicos del Departamento: a **Pili, Manoli, Fina,** así como a **Mariví** e **Ismael,** que ya se marcharon; y a **Marta Fajés.** Creo que puedo hablar por todo el personal si digo que sin vuestra asistencia no sabríamos dónde están ni la mitad de las cosas, ni tendríamos los aparatos en orden, ni sabríamos qué papeles entregar a cada momento. Muchas gracias por toda vuestra ayuda a lo largo de estos años.

Ya fuera del laboratorio, también ha habido gente que moralmente me ha apoyado mucho. Primero, a mi grupo de amigos de toda la vida: **Javi, Fer, Jorge, Diego, Alberto, Marcos, Pol, Adán, Amanda, Juan** y el **Ba** (no sé quién es Edu). Es increíble cómo después de todos estos años seguimos unidos. Ojalá podamos seguir quedando y manteniendo esta amistad como siempre. Gracias por vuestro apoyo.

En segundo lugar, a la gente del *Vasa*. Aún después de todos los años de la carrera, estando cada uno en una parte del planeta nos las apañamos para seguir reuniéndonos de vez en cuando y pasándonoslo tan bien como siempre. Entendéis como nadie las maravillosas virtudes y lo que no son virtudes de la Ciencia. Gracias por vuestra amistad.

Y finalmente, a *mis padres* y a *mi hermana*. Siempre habéis estado y estáis a mi lado apoyándome. Sé que no lo digo muy a menudo, pero muchas gracias por estar allí cada vez que lo necesité. No podría pedir una familia mejor y espero que sigamos mucho tiempo juntos, acabemos donde acabemos cada uno. Os quiero.

“La vida no tiene sentido, se lo das tú, con lo que hagas, con lo que te apasionen, con tus ilusiones.

Tú construyes tu universo a tu medida.”

*Walter Riso*





# RESUMEN

La remodelación del metabolismo energético es una de las características biológicas que presentan las células tumorales, pasando de obtener energía a través de la fosforilación oxidativa a obtenerla mediante la fermentación láctica, incluso en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg. Este hecho puede ser aprovechado para emplearlo como diana antitumoral, mediante el uso de fármacos metabólicos.

En este trabajo, por una parte, se han utilizado los fármacos dicloroacetato (DCA) y metformina para sensibilizar a tumores de origen hematológico a la acción citotóxica de linfocitos T citotóxicos (CTL) y células NK expandidas y activadas *in vitro*. El DCA susceptibiliza a la acción de eCTL y eNK a las células de mieloma múltiple MM.1S, que expresan p53 *wild type*, pero en las células de leucemia linfocítica crónica de tipo B (B-CLL) Mec-1 WT y Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, que expresan p53 mutado, el efecto es el contrario. La susceptibilización de las células MM.1S en este caso depende del aumento en la expresión de ICAM-1, así como del aumento en la expresión de DR5 y de la acción de TRAIL en el caso de las eNK. La metformina, por su parte, susceptibiliza a las células Mec-1 WT y Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> a la acción de eNK y eCTL, pero no así a las células MM.1S. La susceptibilización en este caso depende de la línea celular y de la célula efectora, viéndose implicados LFA-1-ICAM-1, TRAIL y sus receptores y el sistema PD-1-PD-L1.

El DCA también fue capaz de sensibilizar a tumores hematológicos, tanto *in vitro* como en muestras de pacientes de B-CLL, a la acción del fármaco ibrutinib, un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton.

Además de esto, se ha estudiado la correlación entre el metabolismo glucídico de los tumores y su agresividad usando como modelo la línea celular L929dt, derivada del fibroblasto de ratón L929, que sufrió un proceso espontáneo de pérdida de adhesión a la placa de cultivo. Los resultados demuestran que los defectos en las mitocondrias de las células L929dt les conducen a una remodelación completa de su metabolismo, favoreciendo la pérdida de la adhesión, la resistencia al estrés oxidativo y un mayor fenotipo tumorigénico y metastásico.



# ABREVIATURAS

2HE: 2-hidroxietidio

Acetil-CoA: Acetil-Coenzima A

ADCC: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo, *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*

AIF: Factor de Inducción de Apoptosis; *Apoptosis Inducing Factor*

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP; *AMP-activated Protein Kinase*

APC: Célula Presentadora de Antígeno; *Antigen Presenting Cell*

ATP-IF: Factor Inhibitorio 1 de la ATP-sintasa; *ATP-ase Inhibitory Factor 1*

BCA: Bicinchoninic acid assay

Bcl-2: *B-cell lymphoma-2*

B-CLL: Leucemia Linfática/Linfocítica Crónica de tipo B; *B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia*

BCR: Receptor de Células B; *B-Cell Receptor*

BN: Blue-Native

BTK: Tirosina quinasa de Bruton; *Bruton Tyrosine Kinase*

C.I: Complejo I o NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidoreductasa

C.II: Complejo II o succinato deshidrogenasa

C.III: Complejo III o complejo citocromo bc<sub>1</sub>

C.IV: Complejo IV o citocromo c oxidasa

C.V: Complejo V o ATP sintasa

CAR: Receptor de Antígeno Quimérico; *Chimeric Antigen Receptor*

c-FLIP: Inhibidor celular proteico similar a “Flice”; *cellular Flice-Like Inhibitory Protein*

CM-DCF: Clorometil Diclorofluoresceína

CoQ: ubiquinona o coenzima Q

CoQH<sub>2</sub>: ubiquinol o coenzima Q reducida

COX: Enzima Citocromo c oxidasa; *Cytochrome c Oxidase*

COXII: Subunidad II de la enzima citocromo oxidasa; *Cytochrome c Oxidase subunit II*

CTC: Célula Tumoral Circulante; *Circulating Tumor Cell*

CTL: Linfocito T Citotóxico; *Cytotoxic T Lymphocyte*

CTLA-4: *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*

DAMP: Patrones Moleculares Asociados a Peligro; *Danger Associated Molecular Patterns*

DC: Célula Dendrítica; *Dendritic Cell*

DCA: Dicloroacetato

DHE: Dihidroetidio

DNP: Dinitrofenol; Dinitrophenol

DR: Receptor Mortal; *Death Receptor*

ECM: Matriz extracelular; *Extracellular Matrix*

EMT: Transición Epitelio-Mesenquimal; *Epithelial-Mesenchymal Transition*

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos; *Food and Drug Administration*

GLUT1: Transportador de Glucosa 1; *Glucose Transporter 1*

GSH: Glutación reducido; *Reduced Glutathione*

GSSG: Glutación disulfuro u oxidado; *Oxidized or Disulfide Glutathione*

HIF: Factor Inducible por Hipoxia; *Hypoxia Inducible Factor*

HLA: Antígeno Leucocitario Humano; *Human Leukocyte Antigen*

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular 1; *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IDH: Isocitrato Deshidrogenasa; *Isocitrate Dehydrogenase*

IFN: Interferón

IMM: Membrana Mitocondrial Interna; *Inner Mitochondrial Membrane*

KIR: Receptor de células NK; *Killer Immunoglobulin-like Receptor*

LDH: Lactato Deshidrogenasa; *Lactate Dehydrogenase*

LFA-1: *Lymphocyte Function-associated Antigen-1*

mAb: Anticuerpo monoclonal; *Monoclonal Antibody*

MAPK: MAP quinasa; *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MC: Célula Mononuclear; *Mononuclear Cell*

MCT-4: Transportador Monocarboxilato 4; *Monocarboxylate Transporter 4*

MET: Transición Mesenquimal-Epitelial; *Mesenchymal-Epithelial Transition*

mETC: Cadena de Transporte Electrónico Mitocondrial; *mitochondrial Electron Transport Chain*

MFI: Intensidad Media de Fluorescencia; *Mean Fluorescence Intensity*

MGUS: Gammopatía Monoclonal de Significado Incierto; *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad; *Major Histocompatibility Complex*

MICA/B: *MHC class I polypeptide-related sequence A/B*

MMP: Metaloproteasa de la matriz; *Matrix Metalloprotease*

MOMP: Permeabilización de la Membrana Externa Mitocondrial; *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*

mtDNA: DNA mitocondrial; *mitochondrial DNA*

mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*

MTT: Bromuro de dimetil-tiazoliltetrazolio; *Dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide*

NBT: Nitro-azul de tetrazolio; *Nitro Blue Tetrazolium*

NCR: Receptor De Citotoxicidad Natural; *Natural Cytotoxicity Receptor*

NF-κB: Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas; *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*

NK: Asesina Natural; *Natural Killer*

NSCLC: Cáncer de pulmón de células grandes; *Non-Small Cell Lung Cancer*

OCT1: Transportador 1 de Catión Orgánico; *Organic Cation Transporter 1*

OMM: Membrana Mitocondrial Externa; *Outer Mitochondrial Membrane*

OXPHOS: Fosforilación Oxidativa; *Oxydative Phosphorylation*

PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógeno; *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PBMC: Células Mononucleares en Sangre Periférica; *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PBS: Tampón Fosfato Salino; *Phosphate Buffered Saline*

PCG-1 $\alpha$ : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Co-Activator 1 $\alpha$*

PD-1: *Programmed cell death protein-1*

PDK1: Piruvato Deshidrogenasa Quinasa 1; *Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1*

PD-L1: *Programmed cell death protein-1 Ligand*

PI3K/Akt: Fosfoinositol 3-quinasa/Akt; *Phosphoinositide 3-kinase/Akt*

PK: Piruvato Quinasa; *Pyruvate Kinase*

PKM: Isozima de la Piruvato Quinasa; *Pyruvate Kinase Isozyme*

PTK: Proteín Tirosoín Quinasa

R6G: Rodamina-6-G

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno; *Reactive Oxygen Species*

SC: Supercomplejo Respiratorio

SCAF1: Factor de ensamblaje de supercomplejo 1; *Supercomplex Assembly Factor 1*

scFv: Fragmento variable de cadena sencilla; *single chain variable Fragment*

SFB: Suero Fetal Bovino

SI: Sistema Inmunitario

SOD: Superóxido Dismutasa Citosólica

STK: Serín Treonín Quinasa

TCA: Ciclo del Ácido Cítrico; *Tricarboxylic Acid Cycle*

TCR: Receptor de Células T; *T-Cell Receptor*

TGF- $\beta$ : Factor de Crecimiento Transformante-Beta; *Transforming Growth Factor-Beta*

T<sub>h</sub>: Linfocito T auxiliar; *T-Helper Lymphocyte*

TIC: Célula Iniciadora del Tumor; *Tumor Initiating Cell*

TME: Microambiente tumoral; *Tumor Microenvironment*

TNF: Factor de Necrosis Tumoral; *Tumor Necrosis Factor*

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF; *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

T<sub>reg</sub>: Linfocitos T Reguladores

UCB: Sangre de Cordón Umbilical; *Umbilical Cord Blood*

ULBP-1: *UL16 Binding Protein 1*

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial-Vascular; *Vascular Endothelial Growth Factor*

XIAP: Inhibidor Apoptótico Proteico Ligado a X; *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*

$\Delta\psi_m$ : Potencial de Membrana Mitocondrial



# ÍNDICE

---





<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>EL CÁNCER: PROGRESIÓN TUMORAL Y METÁSTASIS.....</b>	<b>3</b>
1.1.1	Visión general del cáncer .....	3
1.1.2	Bases moleculares del cáncer .....	3
1.1.2.1	<i>Transformación tumoral .....</i>	<i>4</i>
1.1.2.2	<i>Propiedades biológicas del cáncer .....</i>	<i>6</i>
1.1.3	Progresión tumoral .....	7
1.1.4	Metástasis tumoral .....	8
1.1.4.1	<i>Transición epitelio-mesenquimal (EMT) .....</i>	<i>9</i>
1.1.4.2	<i>Transición mesenquimal-epitelial (MET) .....</i>	<i>12</i>
<b>1.2</b>	<b>METABOLISMO TUMORAL .....</b>	<b>14</b>
1.2.1	El efecto Warburg .....	15
1.2.2	Metabolismo tumoral: causas y ventajas para la progresión tumoral .....	16
1.2.2.1	<i>Causas del efecto Warburg .....</i>	<i>16</i>
1.2.2.2	<i>Metabolismo tumoral en las etapas iniciales .....</i>	<i>19</i>
1.2.2.3	<i>Metabolismo tumoral en la progresión y metástasis tumoral .....</i>	<i>22</i>
1.2.3	Terapia anti-tumoral con fármacos metabólicos .....	26
1.2.3.1	<i>Alteración del metabolismo de los ácidos grasos .....</i>	<i>26</i>
1.2.3.2	<i>Alteración del metabolismo de los nucleótidos .....</i>	<i>27</i>
1.2.3.3	<i>Alteración del metabolismo de los aminoácidos .....</i>	<i>27</i>
1.2.3.4	<i>Alteración del metabolismo regulado por factores de transcripción .....</i>	<i>28</i>
1.2.3.5	<i>Alteración del balance redox .....</i>	<i>28</i>
1.2.3.6	<i>Alteración del metabolismo de la glucosa y la vía OXPHOS .....</i>	<i>29</i>
<b>1.3</b>	<b>MITOCONDRIA Y CÁNCER .....</b>	<b>33</b>
1.3.1	Características y funciones fisiológicas de la mitocondria .....	33
1.3.1.1	<i>Dinámica mitocondrial .....</i>	<i>34</i>
1.3.1.2	<i>Características genéticas de las mitocondrias .....</i>	<i>35</i>
1.3.1.3	<i>Componentes de la mETC .....</i>	<i>36</i>
1.3.1.4	<i>Organización de la mETC .....</i>	<i>38</i>
1.3.2	Mitocondria en enfermedades .....	39
1.3.2.1	<i>Enfermedades mitocondriales .....</i>	<i>40</i>
1.3.2.2	<i>Mitocondria y cáncer .....</i>	<i>41</i>

<b>1.4</b>	<b>SISTEMA INMUNITARIO Y CÁNCER.....</b>	<b>44</b>
1.4.1	Conceptos generales del sistema inmunitario .....	44
1.4.2	Activación de las células del SI adaptativo .....	46
1.4.3	Mecanismos citotoxicidad de los CTL y las células NK .....	47
1.4.4	El Sistema Inmunitario en el Cáncer .....	50
1.4.4.1	<i>El ciclo de inmunidad anti-tumoral .....</i>	<i>50</i>
1.4.4.2	<i>El modelo de inmunoección del cáncer .....</i>	<i>51</i>
1.4.4.3	<i>Mecanismos de resistencia de los tumores al Sistema Inmunitario .....</i>	<i>52</i>
1.4.4.4	<i>Posible papel del Sistema Inmunitario en la metástasis.....</i>	<i>54</i>
1.4.5	Inmunoterapia del cáncer.....	55
<b>1.5</b>	<b>TUMORES DE ORIGEN HEMATOLÓGICO .....</b>	<b>58</b>
1.5.1	Leucemia linfocítica crónica de tipo B (B-CLL) .....	58
1.5.1.1	<i>Características de la B-CLL .....</i>	<i>58</i>
1.5.1.2	<i>Tratamientos para la B-CLL.....</i>	<i>59</i>
1.5.2	Mieloma múltiple (MM) .....	61
1.5.2.1	<i>Características del MM .....</i>	<i>61</i>
1.5.2.1	<i>Tratamiento del MM.....</i>	<i>62</i>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
2.1	USO COMBINADO DE FÁRMACOS METABÓLICOS CON INMUNOTERAPIA .....	67
2.2	USO COMBINADO DEL DCA CON IBRUTINIB EN TUMORES DE ORIGEN HEMATOLÓGICO.....	68
2.3	LA LÍNEA CELULAR L929dt COMO MODELO DE METÁSTASIS <i>IN VITRO</i> .....	68
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
3.1	CULTIVOS CELULARES .....	73
3.1.1	Líneas celulares.....	73
3.1.2	Materiales y medios de cultivo celulares.....	74
3.1.3	Mantenimiento de los cultivos celulares .....	74
3.1.3.1	<i>Contaje y determinación de la viabilidad celular.....</i>	<i>74</i>
3.1.3.2	<i>Congelación y descongelación de células.....</i>	<i>75</i>
3.1.3.3	<i>Detección de micoplasmas en cultivos celulares.....</i>	<i>75</i>

3.1.4	Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMC) y cordón umbilical (UCB-MC).....	75
3.1.4.1	<i>Expansión de CTL y células NK in vitro</i> .....	76
3.1.4.2	<i>Ensayos de citotoxicidad de los eCTL's y las células eNK contra tumores ....</i>	77
3.1.4.3	<i>Cultivos celulares con muestras de B-CLL</i> .....	78
<b>3.2</b>	<b>ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>79</b>
3.2.1	Extracción y fraccionamiento de lisados celulares.....	79
3.2.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	79
3.2.3	Transferencia de proteínas a membranas .....	80
3.2.4	Análisis de proteínas mediante inmunoblot (Western-Blotting) y detección de los inmunocomplejos. ....	80
3.2.5	Purificación de mitocondrias .....	82
3.2.5.1	<i>Preparación de mitocondrias para análisis de complejos por electroforesis "Blue Native"</i> .....	83
3.2.6	Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida BN.....	83
3.2.6.1	<i>Determinación de la actividad del complejo I y IV en gel</i> .....	84
<b>3.3</b>	<b>GENERACIÓN DE CÍBRIDOS TRANSMITOCONDRIALES .....</b>	<b>84</b>
3.3.1	Cíbridos de origen nuclear L929dt.....	85
3.3.2	Cíbridos de origen mitocondrial L929dt .....	87
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....</b>	<b>87</b>
3.4.1	Extracción de DNA de células en cultivo.....	87
3.4.2	Reacción de PCR .....	88
3.4.3	Electroforesis de DNA en gel de agarosa .....	89
3.4.4	Secuenciación del mtDNA.....	89
3.4.5	Análisis de mutaciones y polimorfismos en el mtDNA por RFLP .....	91
3.4.6	Aislamiento de RNA y obtención de cDNA monocatenario .....	92
3.4.7	Cuantificación del número de copias de mtDNA o transcritos mediante "Real Time" PCR (RT-PCR).....	92
3.4.7.1	<i>Cuantificación del número de copias de mtDNA</i> .....	93
3.4.7.2	<i>Cuantificación del número de copias de un transcrito</i> .....	93
<b>3.5</b>	<b>MEDIDAS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES .....</b>	<b>94</b>
3.5.1	Medida de la actividad de la catalasa .....	94

3.5.2	Medida de la actividad de la SOD .....	95
<b>3.6</b>	<b>MEDICIÓN DE LA RESPIRACIÓN CELULAR.....</b>	<b>96</b>
3.6.1	Electrodo de oxígeno .....	96
3.6.2	Medida de respiración endógena y desacoplada en células intactas .....	97
<b>3.7</b>	<b>MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR.....</b>	<b>98</b>
<b>3.8</b>	<b>ANÁLISIS DEL QUINOMA.....</b>	<b>99</b>
<b>3.9</b>	<b>EXPERIMENTACIÓN <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>100</b>
3.9.1	Modelo animal empleado.....	100
3.9.2	Crecimiento tumoral por inyección subcutánea.....	100
3.9.3	Crecimiento tumoral por inyección intraesplénica.....	101
<b>3.10</b>	<b>CITOMETRÍA DE FLUJO.....</b>	<b>102</b>
3.10.1	Determinación de la translocación de la fosfatidilserina y de daño en la membrana plasmática.....	103
3.10.2	Determinación de la expresión de proteínas de membrana.....	104
3.10.3	Detección de ROS .....	104
<b>3.11</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>105</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>107</b>
<b>4.1</b>	<b>ESTUDIO DE LA CAPACIDAD SENSIBILIZADORA DEL DCA Y LA METFORMINA A LA ACCIÓN CITOTÓXICA DE eCTL's Y eNK's EN TUMORES HEMATOLÓGICOS.....</b>	<b>109</b>
4.1.1	Obtención de eCTL's y células eNK a partir de UCB-MC y PBMC.....	109
4.1.2	Efecto de la metformina sobre la sensibilización de los tumores a la acción citotóxica de los eCTL y células eNK .....	113
4.1.2.1	<i>Capacidad citotóxica de los eCTL y las células eNK provenientes de UCB y PBMC sobre los tumores pre-tratados con metformina.....</i>	<i>113</i>
4.1.2.2	<i>Efecto de la metformina sobre la expresión de proteínas en los tumores ensayados</i>	<i>117</i>
4.1.2.3	<i>Estudio de los mecanismos de sensibilización a los eCTL y eNK por parte de la metformina.....</i>	<i>121</i>
4.1.3	Efecto del DCA sobre la sensibilización de los tumores a la acción citotóxica de los eCTL y células eNK .....	127
4.1.3.1	<i>Capacidad citotóxica de los eCTL y las células eNK provenientes de UCB y PBMC sobre los tumores pre-tratados con DCA.....</i>	<i>127</i>
4.1.3.2	<i>Efecto del DCA sobre la expresión de proteínas en los tumores ensayados</i>	<i>129</i>

4.1.3.3	<i>Estudio de los mecanismos de sensibilización a los eCTL y eNK por parte del DCA</i>	133
4.1.4	Discusión sobre la capacidad citotóxica de los eCTL y células eNK sobre tumores hematológicos pre-tratados con DCA o metformina .....	139
4.1.4.1	<i>Discusión sobre la susceptibilización del DCA en tumores hematológicos a la acción citotóxica de eCTL y células eNK .....</i>	140
4.1.4.2	<i>Discusión sobre la susceptibilización de la metformina en tumores hematológicos a la acción citotóxica de eCTL y células eNK .....</i>	143
<b>4.2</b>	<b>EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE DCA E IBRUTINIB SOBRE TUMORES DE ORIGEN HEMATOLÓGICO.....</b>	<b>147</b>
4.2.1	Efecto de la combinación de DCA e ibrutinib sobre líneas celulares tumorales	147
4.2.2	Efecto de la combinación de DCA e ibrutinib sobre muestras de pacientes de B-CLL	150
4.2.3	Discusión sobre el efecto combinatorio de DCA con ibrutinib en tumores de origen hematológico.....	153
<b>4.3</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR L929dt COMO POSIBLE MODELO DE METÁSTASIS IN VITRO.....</b>	<b>155</b>
4.3.1	Mecanismos de resistencia al estrés oxidativo .....	155
4.3.2	Implicación del C.V en el fenotipo de las células L929dt .....	157
4.3.3	Secuenciación del mtDNA de las células L929 y L929dt .....	157
4.3.4	Capacidad tumorigénica de las células L929dt <i>in vivo</i> por inyección subcutánea	159
4.3.5	Capacidad tumorigénica de las células L929dt <i>in vivo</i> por inyección intraesplénica	162
4.3.6	Análisis comparado del quinoma de las células L929 y L929dt.....	167
4.3.7	Generación de los híbridos dt <sup>L929</sup> y L929 <sup>dt</sup> .....	170
4.3.8	Caracterización de los híbridos dt <sup>L929</sup> y L929 <sup>dt</sup> .....	172
4.3.8.1	<i>Sensibilidad a DCA .....</i>	172
4.3.8.2	<i>Expresión de MHC-I.....</i>	174
4.3.8.3	<i>Capacidad respiratoria.....</i>	175
4.3.8.4	<i>Organización de los SC's .....</i>	177
4.3.8.5	<i>Formación de ROS.....</i>	179
4.3.8.6	<i>Número de copias del mtDNA.....</i>	180
4.3.8.7	<i>Número de copias de la ATP-IF .....</i>	180

4.3.9	Capacidad tumorigénica de los cíbridos $dt^{L929}$ y $L929^{dt}$ <i>in vivo</i> por inyección intraesplénica .....	182
4.3.10	Generación de los cíbridos $dt^{B16}$ , $B16^{dt}$ , $dt^{MC57G}$ y $MC57G^{dt}$ .....	184
4.3.11	Discusión.....	187
5	CONCLUSIONES.....	193
6	BIBLIOGRAFÍA.....	197

# INTRODUCCIÓN

---





## 1.1 EL CÁNCER: PROGRESIÓN TUMORAL Y METÁSTASIS

### 1.1.1 Visión general del cáncer

El cáncer, al contrario que otras muchas enfermedades, no es una enfermedad concreta y definida, sino un conjunto de ellas. Así pues, el cáncer es un conjunto de enfermedades donde las células neoplásicas, derivadas de células normales, adquieren la habilidad de multiplicarse de forma descontrolada y, eventualmente, viajar y dispersarse por todo el organismo. Estas células pueden potencialmente influir de forma negativa sobre el tejido que invaden, pudiendo producir eventualmente un fallo en el organismo que conduce a la muerte.

El cáncer se describió ya por primera vez alrededor del año 1600 a.C. en el Antiguo Egipto, y fue Hipócrates (460-370 a.C.) quien utilizó el término *karkinos* para describir este tipo de lesiones (Sudhakar, 2009). Posteriormente, en la época romana, esta palabra se adaptó al latín, acuñándose el término *cáncer*. Sin embargo, no ha sido hasta los siglos XX y XXI, gracias a la evolución tecnológica y al interés en este conjunto de enfermedades, cuando realmente se han hecho avances determinantes para el conocimiento, detección y tratamiento del cáncer.

Existen descritos más de 100 tipos de cáncer, algunos con mucha mayor incidencia y mortalidad que otros. Actualmente, el cáncer de pulmón es el que produce más muertes anualmente, seguido del cáncer hepático y del colorrectal. Este conjunto de enfermedades constituye actualmente la segunda causa de muerte en el mundo occidental. De hecho, en el año 2012, se diagnosticaron alrededor de 14 millones de nuevos casos y produjo 8,8 millones de defunciones en todo el mundo (Espina et al., 2018) y, al menos en España, se estima que en 2035 se habrá alcanzado la cantidad aproximada de 24 millones de casos totales diagnosticados ("Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM): Las Cifras del Cáncer en España. 2018,"). Es por ello que la importancia de la investigación contra el cáncer es y será esencial en todo el mundo para poder entender su complejidad y así combatirlo de forma efectiva.

### 1.1.2 Bases moleculares del cáncer

La carcinogénesis, u oncogénesis, es un proceso mediante el cual una célula normal del organismo se transforma en tumoral. Las células tumorales, debido a la acumulación de mutaciones en su material genético, comienzan a proliferar de manera autónoma y descontrolada, formando un nuevo tejido o neoplasia (Vogelstein & Kinzler, 1993). Este tumor inicialmente crece de manera local, en su tejido originario. En este estadio de crecimiento se conoce como tumor primario. No obstante, y si el Sistema Inmunitario (SI) no lo evita, el tumor puede avanzar en su crecimiento, acumulando más mutaciones en el genoma que le permiten

adquirir características invasivas, pasando a ser un tumor maligno. Finalmente, estas células malignas pueden abandonar el tejido originario, extravasarse a los vasos sanguíneos para viajar y colonizar otros tejidos del organismo. Este último proceso se conoce como metástasis (Steeg, 2016).

Existen varios factores de riesgo a la hora de desarrollar un cáncer. Por una parte, existen factores ambientales como el consumo de tabaco, alcohol, obesidad, exposición a radiaciones ionizantes o la dieta, que son capaces de alterar determinados tejidos tras una exposición continuada a ellos, y se pueden prevenir, al menos en cierta medida. Por otra parte, existen otros factores como la predisposición genética o la edad, que no se pueden prevenir. Cualquiera de estos elementos puede propiciar daño en el DNA. A pesar de ello, las células normales poseen mecanismos de defensa ante estas mutaciones. Normalmente, al detectar un error, la célula programa su propia muerte, proceso conocido como *apoptosis*. Sin embargo, si dicha célula ha adquirido nuevos mecanismos de resistencia contra la *apoptosis*, la célula continuará creciendo (Evan & Littlewood, 1998).

### **1.1.2.1 Transformación tumoral**

Actualmente, está aceptado que el proceso de transformación tumoral requiere una serie de eventos en la célula para que suceda. Para que se produzca una transformación tumoral, las células deben primero haber estado sujetas a ciertas mutaciones que afectan a 3 aspectos fundamentales en su crecimiento y regulación:

**Potencial replicativo ilimitado.** Las células normales tienen una capacidad de replicación limitada (Hayflick, 1997). Esto es debido principalmente a la pérdida progresiva de la actividad de la enzima telomerasa, cuya actividad consiste en replicar los telómeros de los cromosomas. Esta función es esencial para mantener la estabilidad del genoma. Por lo tanto, conforme pasa el tiempo, los telómeros se van acortando debido a esta pérdida de actividad, y esto termina provocando eventualmente la inhibición de la replicación celular (Hayflick, 1997). Sin embargo, las células tumorales recuperan dicha actividad telomerasa, volviéndose constitutivamente activa, lo cual implica el mantenimiento de la longitud de los telómeros y, así, el desbloqueo del límite replicativo (Shay & Bacchetti, 1997).

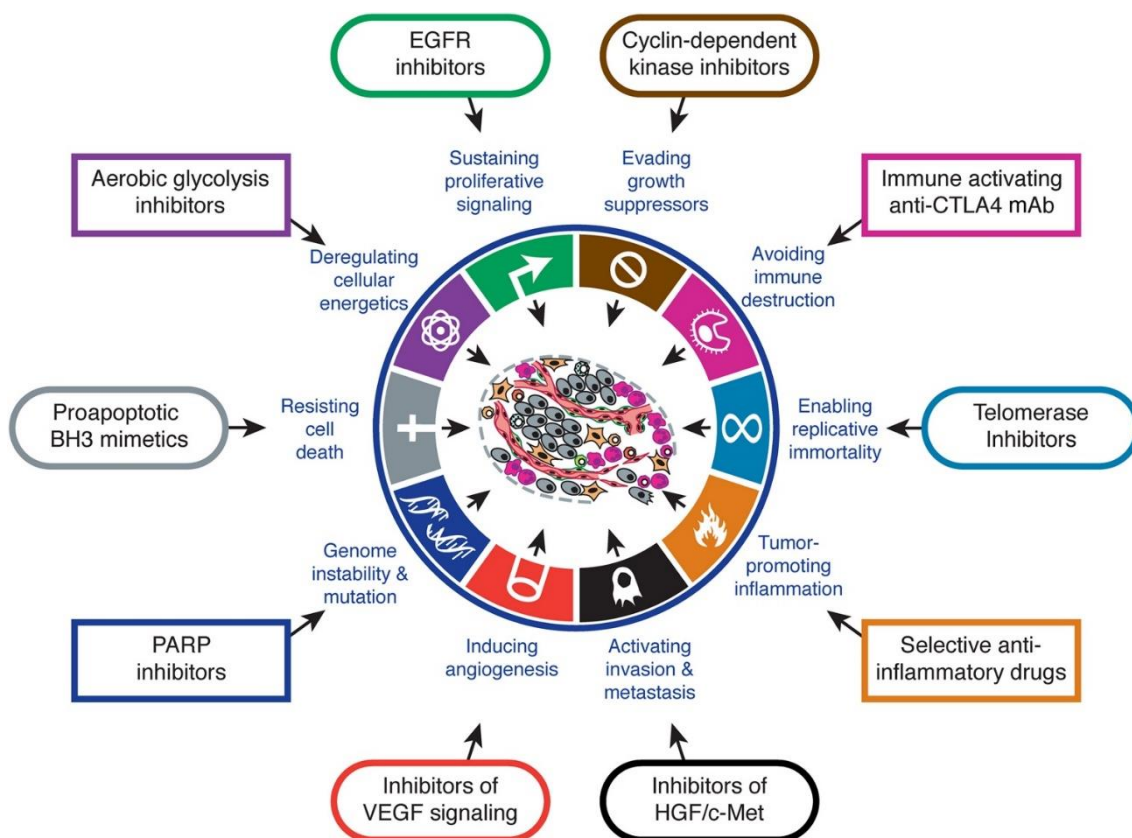
**Inactivación de genes supresores de tumores.** Dichos genes suelen estar asociados al control del ciclo celular en función de las señales de crecimiento del entorno (en forma de citoquinas o factores de crecimiento) o del daño interno de la célula (lesión de un orgánulo, daño en el DNA, etc.). Los ejemplos más representativos son los genes que codifican la proteína del retinoblastoma (pRb) y, sobre todo, p53 (Morris & Chan, 2015). Una mutación en alguno de estos

genes conlleva una falta de sensibilidad a errores internos y a las señales antiproliferativas, impidiendo de esta forma la parada en el ciclo celular para la corrección de errores, o la inducción de apoptosis en la célula, promoviendo la división celular anómala.

***Ganancia de actividad de protooncogenes.*** Los protooncogenes son genes que codifican proteínas que participan en el control del crecimiento celular de forma fisiológica. Cuando estos genes sufren una mutación, puede ocurrir que codifiquen proteínas patológicamente activas o que las sobreexpresen, provocando que la célula sufra un crecimiento acelerado, sin control e independiente de las señales de crecimiento del entorno. A estos genes mutados se les denomina oncogenes. Se han descrito diversos oncogenes en células tumorales como, por ejemplo, proteínas citoplasmáticas de transducción de señal, receptores de factores de crecimiento, o ciclinas (Cantley et al., 1991).

Una vez que se han cumplido estos requisitos, la célula resultante es considerada como célula tumoral y dará lugar a una neoplasia. Dicha célula tumoral, conforme se vaya dividiendo, y al poseer los fallos en su maquinaria comentados con anterioridad, irá acumulando mutaciones, variando su genotipo y fenotipo con el tiempo (Nowell, 1986).

A pesar de lo mencionado, cada una de las células que constituyen el tejido tumoral no son idénticas entre sí, sino que existe heterogeneidad. Esto es debido a que, conforme se van multiplicando, algunas de ellas sufrirán un tipo de mutaciones, mientras que otras no lo sufrirán o les ocurrirán otras, formando diferentes clones a partir de la original. El modelo tradicional de expansión clonal sugiere que existen rondas de expansiones de un solo clon que van dominando sucesivamente el tejido neoplásico (Greaves & Maley, 2012). Sin embargo, dada la alta tasa de mutación en los tumores, es más probable que acaben conviviendo muchos clones distintos antes de que una población llegue a dominar sobre otra, fenómeno que se conoce como interferencia clonal (de Visser & Rozen, 2006). Este modelo policlonal explica que el SI pueda atacar eficientemente a algunas de las células cancerígenas, pero no a otras, o que un tratamiento no consiga reducir al completo la masa tumoral. Finalmente, existe un modelo de jerarquía dentro del tumor sobre el cual existiría una población de células iniciadoras del tumor (TIC's) capaces de auto-renovarse, con capacidad para conservar la tumorigenicidad y de diferenciarse en el resto de poblaciones del tumor, con diferencias tanto genéticas como epigenéticas entre ellas (Hermann et al., 2007). Esta población se conoce como Células Madre Tumorales o Cancerígenas (Sancho, Barneda, & Heeschen, 2016).



**Figura 1.1.** Características comunes en el desarrollo de los tumores y ejemplos ilustrativos de terapias para combatirlos (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 1.1.2.2 Propiedades biológicas del cáncer

El cáncer es una enfermedad muy altamente heterogénea. Como ya se ha comentado, a lo largo de los años se han descrito más de 100 tipos de cánceres; incluso pueden encontrarse subtipos de cánceres dentro del propio tejido neoplásico (Grizzi & Chiriva-Internati, 2006; Y. Wang et al., 2014). El proceso de carcinogénesis es inespecífico de tejido y puede originarse por una gran variedad de mutaciones. A pesar de su gran heterogeneidad, las células cancerosas durante su desarrollo poseen una serie de propiedades comunes que las definen, lo que se conoce como los 'Hallmarks' o marcadores del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2000). Varias de estas características ya han sido mencionadas, como la evasión de la apoptosis, el potencial replicativo ilimitado, y la falta de sensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento. Además de estas propiedades, se incluyen: angiogénesis prolongada en el tiempo, autosuficiencia sobre los factores de crecimiento e invasión de los tejidos y metástasis. Un mayor conocimiento de la biología del cáncer ha permitido la revisión posterior de este trabajo, donde se han añadido otras características comunes que comparten los tumores: inflamación del tumor, inestabilidad genómica, evasión de la respuesta inmunitaria y remodelación del metabolismo energético

(Figura 1.1) (Hanahan & Weinberg, 2011). Varios de estos aspectos de la biología del tumor serán abordados en apartados posteriores de esta introducción.

### 1.1.3 Progresión tumoral

Una vez que se ha producido la transformación neoplásica, la célula cancerosa comienza a multiplicarse en su tejido de origen. Es aquí donde comienza la fase de crecimiento tumoral, donde el tumor recién formado deberá enfrentarse a diversas adversidades para poder progresar en su empeño proliferativo. Es de hecho este proceso de supervivencia el que, al menos en parte, empuja a las células tumorales a adquirir de forma darwiniana el genotipo y el fenotipo necesario que las caracteriza; en definitiva, sus propiedades biológicas (Nowell, 1986).

A excepción de las leucemias (y en menor grado, otros tumores hematológicos), las cuales se desplazan con la sangre circulante, todos los tumores crecen formando una masa sólida en su tejido de origen o tumor sólido. En dicho tumor, se pueden diferenciar dos compartimentos: el parénquima, constituido por las propias células neoplásicas, y el estroma, formado por el tejido que lo rodea (Connolly et al., 2003). Estos tejidos se encuentran íntimamente interconectados. El estroma, de hecho, es el producto de las interacciones del tumor con el órgano hospedador, que induce su formación para poder recibir los nutrientes necesarios para su crecimiento. Este tejido circundante estromal está constituido por el tejido conectivo que rodea al parénquima, los vasos sanguíneos y las células del SI que se infiltran en el tumor (Bremnes et al., 2011). Todos estos tejidos mencionados, y las interacciones que existen entre ellos, constituyen el microambiente tumoral (TME).

Durante las diversas etapas de progresión del cáncer, el estroma va siendo modificado por las señales provenientes del tumor sólido, con el objetivo de favorecer sus demandas energéticas y su fenotipo progresivamente más agresivo. La influencia del metabolismo energético de los tumores en las diversas etapas del cáncer se explicará en el *Apartado 1.2*.

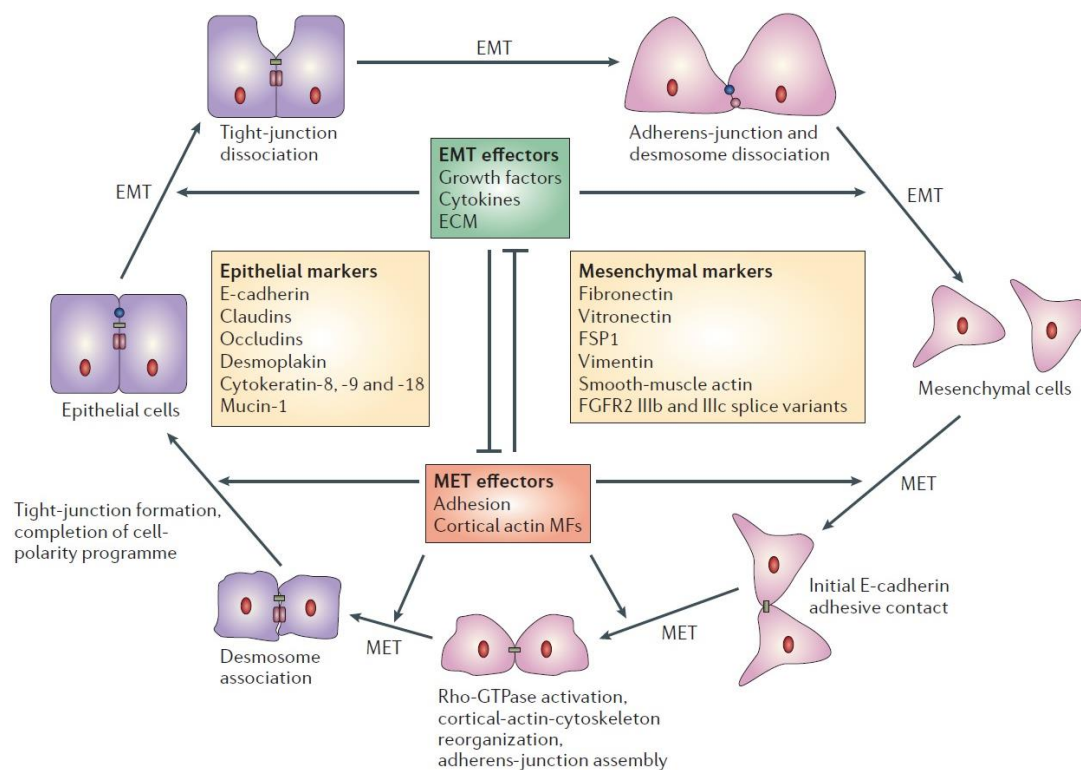
El comportamiento gradualmente más agresivo e invasivo de los tumores viene dado por varias razones distintas, pero no excluyentes entre sí. Por una parte, dado que la célula tumoral posee una menor capacidad de reparación de errores genéticos y mayor resistencia a la muerte celular programada que una célula normal, dicha célula tumoral es más propensa a la acumulación de errores en su material genético que, eventualmente, le dirigirán hacia un fenotipo invasivo. Por otra parte, la célula tumoral debe también adaptarse al TME que la rodea, lo que le lleva a realizar cambios epigenéticos para poder sobrevivir. Estos cambios adaptativos hacen derivar estas células hacia la progresión tumoral y, por tanto, hacia una mayor malignidad (Scheel, Onder, Karnoub, & Weinberg, 2007).

Finalmente, pero no menos importante, se encuentra la influencia del SI sobre el tumor. Tal como se expondrá con mayor detalle en el *Apartado 1.4*, las células inmunitarias, en su intento de erradicar el tumor primario, pueden acabar seleccionando a aquellas células tumorales que son más resistentes, además de imponer cierta presión adaptativa sobre ellas. Este modelo se conoce como *Inmunoedición del Cáncer* (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002).

### 1.1.4 Metástasis tumoral

Así pues, una vez que el tumor sólido ha sobrepasado las defensas del organismo hospedador, comienza a crecer sin control. Ahora bien, para poder salir de su tejido de origen y viajar e invadir otros tejidos, se deben cumplir ciertas condiciones y debe adquirir ciertas características que se lo permitan. En esta fase de metástasis, las células tumorales realizan numerosas interacciones tanto con la matriz extracelular (ECM), como con las membranas que delimitan la propagación del tumor, células de la circulación y el microambiente del tejido secundario donde se vayan a establecer. El proceso en su conjunto se puede resumir clásicamente en dos etapas bien diferenciadas. En la primera, las células tumorales pierden la adhesión al tejido de origen y se intravasan al torrente sanguíneo o a la linfa, proceso conocido como *transición epitelio-mesenquimal (EMT)*. En la segunda etapa, las células metastásicas se extravasan del líquido circulante del organismo y readquieren la capacidad de adherirse a otro tejido distinto al de origen, anclándose de esta manera a él y formando un tumor secundario, fenómeno denominado *transición mesenquimal-epitelial (MET)*.

Durante los últimos años, esta visión binaria de la metástasis se ha puesto parcialmente en duda, ya que al parecer podría constar no solamente de dos fases, sino que habría varias fases de transición, donde las células tumorales van adquiriendo de forma progresiva su habilidad de invadir otros tejidos, coexistiendo varias subpoblaciones de células con distinto grado de capacidad metastásica (Pastushenko et al., 2018) (*Figura 1.2*). Asimismo, no todas las células tumorales del parénquima realizan esta transición, sino que es más probable que aquellas que estén más en contacto con el estroma sufran estas transformaciones, mientras que aquellas que se encuentran hacia el interior de la masa tumoral, sufran este proceso de forma parcial, o directamente no lo sufran. Esto provoca un gradiente de EMT dentro del tumor que refuerza la idea de su heterogeneidad (Huang et al., 2013).



**Figura 1.2.** Etapas de conversión de fenotipo epitelial a mesenquimal, y viceversa (Thiery & Sleeman, 2006).

#### 1.1.4.1 Transición epitelio-mesenquimal (EMT)

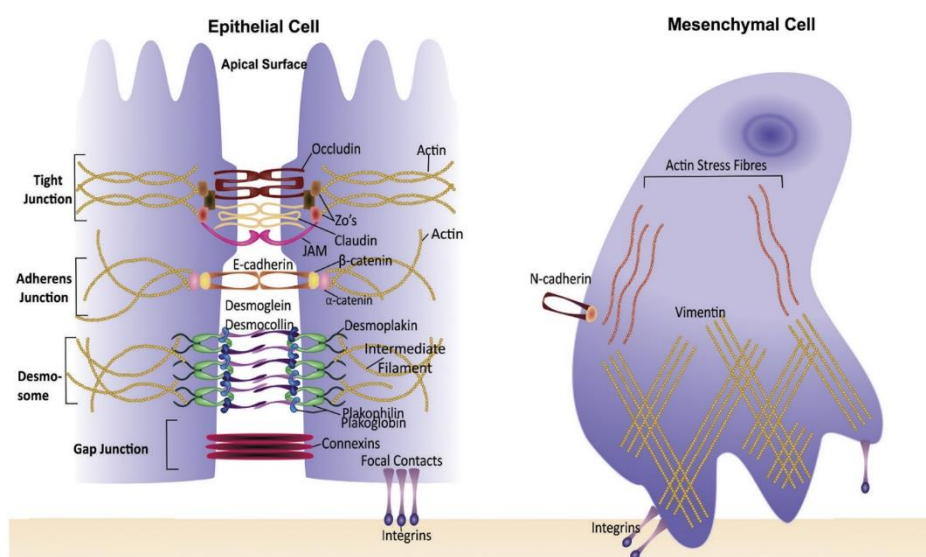
Las células epiteliales del organismo expresan E-cadherina como proteína de adhesión entre células del mismo tipo. Por consiguiente, la ausencia de esta proteína se ha utilizado clásicamente como marcador para la detección de células tumorales que han sufrido el proceso de EMT (Thiery & Sleeman, 2006). Del mismo modo, la N-cadherina y la vimentina son marcadores celulares que se usan comúnmente para fenotipar células mesenquimales (Ngan et al., 2007). No obstante, al no ser la EMT un proceso directo, sino que requiere una serie de pasos para su maduración, se pueden encontrar fenotipos intermedios metaestables entre célula epitelial y mesenquimal (Tam & Weinberg, 2013).

La EMT es un proceso complejo en el que deben suceder varios pasos que intentaremos describir:

**Inducción de angiogénesis.** Tras la carcinogénesis, la mayoría de los tumores recién formados se encuentran confinados en un compartimento epitelial. Esto implica que el único oxígeno que les puede llegar es a través de difusión y, en ausencia de nuevos vasos sanguíneos que se lo proporcione, no crecerán más de  $1 \text{ mm}^3$  (Folkman, 2002). En este estado, las células tumorales recién formadas entran en hipoxia. El estado de hipoxia induce en las células la expresión y secreción de factores proangiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF) (Ellis & Hicklin, 2008) y el factor de crecimiento de fibroblastos (Relf et al., 1997).

Estos factores atraen a células endoteliales, las cuales participarán en la degradación de las paredes de capilares cercanos, provocando la neovascularización en dirección a la fuente de los factores de crecimiento, en este caso el propio tumor (Bielenberg & Zetter, 2015).

**Remodelación del citoesqueleto.** En las células epiteliales, el citoesqueleto de actina, los filamentos intermedios y la red de microtúbulos forman una estructura uniforme y rígida, proporcionando la tensión adecuada para que mantengan su forma poligonal y favoreciendo las interacciones célula-célula (Axelrod, 2006). En cambio, las células mesenquimales son morfológicamente irregulares, de forma elongada y fusiforme (*Figura 1.3*). Sus filamentos de actina se ordenan en ramas de fibras de estrés, favoreciendo proyecciones de éstas que le permiten mayor movimiento y recepción sensorial. Además, expresan menos queratina y más vimentina, lo que les permite en su conjunto ser más flexibles y menos propensas al daño durante la migración (Williams, Engler, Slone, Galante, & Schwarzbauer, 2008). Al parecer, la dinámica del citoesqueleto vendría regulada por la activación de las proteínas de choque térmico 90 (Hsp90, chaperonas mitocondriales) en respuesta al estrés metabólico ligado al proceso de desadherencia (Caino et al., 2013). En su conjunto, la remodelación del citoesqueleto en las células tumorales es un proceso necesario e indicativo de mayor agresividad (Fife, McCarroll, & Kavallaris, 2014).



**Figura 1.3.** Esquema de las diferencias morfológicas entre células epiteliales y mesenquimales. Modificado de (M. Singh, Yelle, Venugopal, & Singh, 2018).

**Resistencia a la anoikis.** En condiciones normales, las células de un tejido se mantienen unidas entre ellas mediante interacciones que les confieren señales esenciales para el crecimiento o la supervivencia. La *anoikis* es un evento de muerte celular programada que se desencadena en alguna de estas células cuando pierden la adhesión con el resto de células o con la ECM (Frisch & Francis, 1994). Esto supone para las células tumorales en crecimiento una limitación a la hora de poder realizar la EMT, por lo que deben desarrollar mecanismos de



resistencia a la anoikis para poder ser invasivas. Varias vías de señalización han sido identificadas como rutas afectadas por señales de anoikis, tales como aquellas en las que participan la fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt (PI3K/Akt) y Raf (Paoli, Giannoni, & Chiarugi, 2013), además de las vías tanto intrínseca como extrínseca de la apoptosis (Simpson, Anyiwe, & Schimmer, 2008). Las células tumorales tienen varias alternativas para evitar esta clase de muerte como, por ejemplo, la sobreactivación de ILK (Attwell, Roskelley, & Dedhar, 2000) o FAK (Xia, Nho, Kahm, Kleidon, & Henke, 2004), el aumento en la expresión y actividad del inhibidor celular proteico similar a “Flice” (c-FLIP) (Kim, Suh, Sporn, & Reed, 2002) o el inhibidor apoptótico proteico ligado a X (XIAP) (Krajewska et al., 2003).

**Secreción de metaloproteasas:** las metaloproteasas de la matriz (MMP's) son una familia de endopeptidasas que se encargan de la remodelación de tejido y la degradación de la ECM. En situación fisiológica, las MMP's apenas son expresadas, con el objetivo de mantener la homeostasis de los tejidos (Kapoor, Vaidya, Wadhwani, Kaur, & Pathak, 2016). Además, el organismo posee inhibidores endógenos e inhibidores de tejido de MMP's para controlar su actividad. En el cáncer, la expresión y actividad de las MMP's se encuentra aumentada, siendo la MMP-9 la que parece jugar un papel más importante durante la EMT (Deryugina & Quigley, 2006). La secreción en su forma activa de las MMP's por parte de las células tumorales les permite remodelar la ECM, favoreciendo su crecimiento de dos formas: una, remodelando el TME para facilitar la angiogénesis, y dos, rompiendo las paredes de los vasos sanguíneos, invadiendo así el estroma para entrar en la circulación (*intravasación*) (Lynch & Matrisian, 2002).

Todos estos eventos involucrados en la EMT parecen estar regulados por la activación de ciertos factores de transcripción. Aquellos mejor caracterizados en este contexto son las proteínas de la familia SNAIL (principalmente SNAIL1 y SNAIL2), las de la familia ZEB (*Zinc finger E-Box protein*) (ZEB-1 y ZEB-2) y las de la familia Beta-hélice-bucle-hélice (βHLH) (TWIST1 y TWIST2) (Peinado, Olmeda, & Cano, 2007). Asimismo, cada vez se van acumulando más evidencias de que estos factores de transcripción están gobernados por numerosos miRNA's, cuya síntesis aumenta en tumores más agresivos (Díaz-López, Moreno-Bueno, & Cano, 2014). De hecho, se ha observado que carcinomas poco diferenciados presentan bajos niveles de expresión de miRNA (Lu et al., 2005).

Finalmente, el estroma juega un papel importante en este proceso de EMT (Nieto, Huang, Jackson, & Thiery, 2016). Una gran parte de la población estromal está formada por fibroblastos asociados al cáncer (CAF). En los últimos años, se ha observado que estos CAF's pueden favorecer

la agresividad del tumor tras su interacción con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) liberado por el tumor (Calon et al., 2015) o rompiendo la membrana basal (Glentis et al., 2017).

### **1.1.4.2 Transición mesenquimal-epitelial (MET)**

Después de toda la serie de eventos comentados en el apartado anterior, las células tumorales pasan a la circulación, denominándose células tumorales circulantes (CTC's). Es ahora cuando debe suceder la segunda transición para que se complete el proceso de metástasis, la llamada transición mesenquimal-epitelial (MET). Así como de la EMT se conocen (en mayor o menor medida) muchos de los factores implicados, hay menos datos para explicar la MET. A pesar de ello, se han descrito algunos pasos principales:

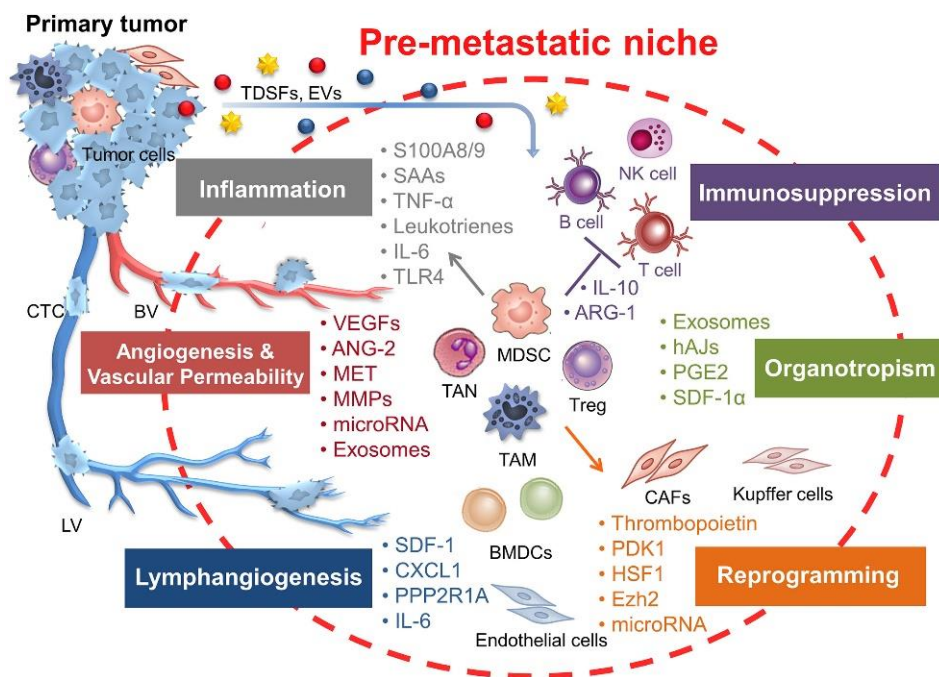
**Diseminación por el organismo.** El mero hecho de haber conseguido intravasarse no es suficiente para producir metástasis *per se*. Tanto la sangre como la linfa son, de hecho, ambientes hostiles para las CTC's y se estima que solamente el 1% de ellas sobreviven y forman tumores secundarios (Oppenheimer, 2006). El tamaño aproximado de las células circulantes de carcinoma suele oscilar entre 20-30  $\mu\text{m}$ , mientras que los capilares suelen tener un diámetro de unos 8  $\mu\text{m}$  (Chambers, Groom, & MacDonald, 2002). A pesar de ello, poseen una vida media de entre 1-2,4 horas en la sangre, e incluso pueden persistir allí durante años de forma latente en individuos sin relapso en sus antiguas neoplasias (Meng et al., 2004). Por tanto, o bien hay unas pocas CTC's de tamaño excepcionalmente pequeño que pueden atravesar los capilares, o bien las alteraciones del citoesqueleto (ya mencionadas en el *Apartado 1.1.4.1*) les permiten tener una gran flexibilidad (Chaffer & Weinberg, 2011).

**Extravasación.** El proceso de extravasación de las células tumorales en un nuevo tejido a invadir se produce en varias etapas: la adhesión de las CTC's al endotelio vascular, la modulación de la barrera de dicho endotelio y, por último, la *migración transendotelial* para llegar a los tejidos de las capas inferiores (Strilic & Offermanns, 2017). Primeramente, las CTC's se pueden anclar a la pared capilar, o bien porque pueden quedar atrapadas debido a su tamaño, o bien por procesos de adhesión entre la CTC y la célula endotelial (Bendas & Borsig, 2012). Seguidamente, deben modular la pared endotelial y migrar. El mecanismo más común para lograrlo es a través de la *migración paracelular*, durante la cual las células tumorales se extravasan entre 2 células endoteliales. Este mecanismo incluye la formación, por parte de la CTC, de una estructura adhesiva y protrusiva llamada *invadopodio* (Leong et al., 2014). Este complejo está compuesto por proteínas estructurales, tales como cortactina, N-WASP (*Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*), Tsk-4 y Tsk-5. Estas proteínas no sólo forman hendiduras profundas en la pared vascular sino que, a su vez, concentran MMP's para romper localmente la ECM y permitir la salida del

tumor (Clark, Whigham, Yarbrough, & Weaver, 2007). Otros factores que pueden favorecer la extravasación del tumor son las plaquetas y los leucocitos de la circulación sanguínea (Kitamura, Qian, & Pollard, 2015), como se comentará en mayor detalle en el *Apartado 1.4.4.4*.

***Colonización del tejido secundario.*** Este proceso es, por lo general, un paso extremadamente ineficiente para las CTC's, muriendo la mayoría de ellas en las primeras 24 horas de colonización. Además, las que sobreviven pueden quedarse aisladas en estado de quiescencia o formar *micrometástasis* (es decir, formar pequeñas lesiones sin crecimiento tumoral) (Luzzi et al., 1998). Para que la célula tumoral colonizadora sobreviva y pueda iniciar una lesión en el tejido secundario, es importante que revierta de nuevo su fenotipo de célula mesenquimal a célula epitelial. Si bien el proceso de MET está poco estudiado, parece que la célula tumoral sigue el proceso inverso de EMT, es decir: remodelación de los miRNA, represión de los factores de transcripción responsables de la EMT (SNAIL, TWIST, ZEB, etc.), inactivación de la ruta de la PI3K/Akt y expresión de E-cadherina, entre otros (Yao, Dai, & Peng, 2011). No obstante, esta reversión de fenotipo no parece ser obligatoria en todos los casos. De hecho, se sabe que existen metástasis de células mesenquimales (Jolly, Ware, Gilja, Somarelli, & Levine, 2017). Una explicación posible sería que las CTC's no siempre realizan una MET completa, sino que puede ser parcial, conservando todavía características fenotípicas mesenquimales (Chao, Wu, Acquafondata, Dhir, & Wells, 2012).

Las CTC's poseen cierta predilección por crecer en determinados tejidos (de Groot, Roy, Brown, Pienta, & Amend, 2017). Este hecho ya fue observado a finales del siglo XIX por Stephen Paget. Este médico propuso que, al igual que las semillas de una planta, las células metastásicas se reparten por todas las direcciones, sin embargo, sólo pueden crecer en determinados ambientes (Paget, 1889). Esta hipótesis se conoce como "*seed and soil*", donde la semilla (*seed*) sería el tumor circulante y el suelo (*soil*) sería el microambiente del órgano hospedador. Por tanto, es necesario un cierto organotropismo entre las CTC's y el órgano donde se formará el tejido secundario para que el proceso de metástasis tenga mayor probabilidad de éxito.



**Figura 1.4.** Características del nicho pre-metastático (Y. Liu & Cao, 2016a).

Por otra parte, el TME del tejido secundario también podría jugar un papel importante en la adaptación de las CTC's a su nuevo nicho. El llamado nicho pre-metastático (*Figura 1.4*) constituye un microambiente de un tejido que ha sufrido previamente una serie de cambios celulares y moleculares para que las CTC's tengan una mayor facilidad para prosperar en el proceso de colonización (Kaplan et al., 2005). Parece que tanto las propias células tumorales como las células estromales hospedadoras participan en la formación del nicho pre-metastático (Y. Liu & Cao, 2016a). Las primeras, liberando diversos componentes moleculares, llamados factores secretados derivados del tumor, que modulan el comportamiento de otras células circulantes; y las segundas, principalmente induciendo angiogénesis y remodelación del tejido hospedador (Y. Liu & Cao, 2016a).

## 1.2 METABOLISMO TUMORAL

De todos los cambios que se producen durante la transformación tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011), es relevante para esta tesis doctoral exponer la remodelación del metabolismo en los tumores en las distintas etapas de progresión tumoral, su impacto en la malignidad del tumor y las terapias basadas en la alteración de dicho metabolismo.

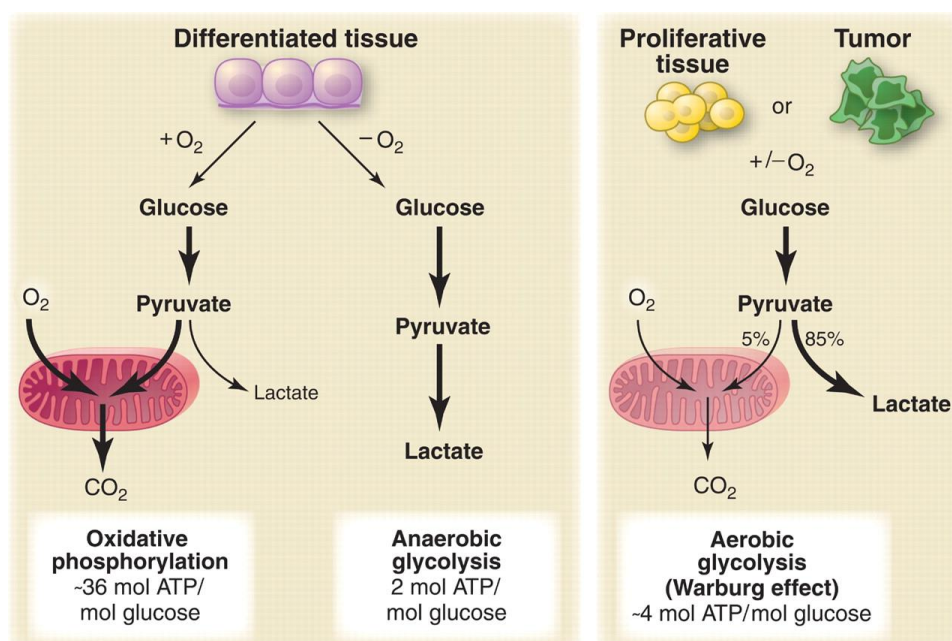
### 1.2.1 El efecto Warburg

Durante la respiración aerobia, las células normales del organismo derivan el piruvato obtenido de la glucólisis a la mitocondria, donde se llevará a cabo el ciclo del ácido cítrico (TCA) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS), obteniendo de esta manera el mayor rendimiento energético posible (36 moléculas de ATP por molécula de glucosa). No obstante, puede haber ocasiones en las que no haya oxígeno disponible, situación celular denominada *hipoxia*. En este caso, si la célula está en una situación de demanda energética, derivará el piruvato a lactato mediante fermentación láctica en el citoplasma, obteniendo un rendimiento energético mucho menor (2 moléculas de ATP por molécula de glucosa). Este proceso se conoce como *respiración anaerobia* (Figura 1.5).

Las primeras observaciones acerca de los cambios en el metabolismo en las células tumorales fueron hace cerca de un siglo, cuando el fisiólogo alemán Otto Warburg descubrió que las células cancerígenas consumían una mayor cantidad de glucosa que las células normales provenientes de tejidos sanos (Warburg, Posener, & Negelein, 1924) (Warburg, Wind, & Negelein, 1927). Este mayor consumo de glucosa se debía a que las células tumorales presentaban una tendencia a realizar la fermentación láctica en lugar de la respiración aerobia, incluso en presencia de oxígeno, llevando a cabo la *glucólisis aerobia*. Al ser la fermentación un proceso menos eficiente energéticamente que la vía OXPHOS, las células tumorales se encuentran forzadas a consumir una mayor cantidad de glucosa y, por tanto, a producir grandes cantidades de lactato en el TME. Globalmente, este fenómeno es conocido como *efecto Warburg* (ver Figura 1.5).

Poco después, el bioquímico británico Herbert Grace Crabtree observó que un aumento en la concentración de glucosa del medio inducía paradójicamente una disminución de la respiración celular (Crabtree, 1929), fenómeno que se ha confirmado posteriormente también en células tumorales y que se denomina *efecto Crabtree* (Díaz-Ruiz, Rigoulet, & Devin, 2011).

Gracias al descubrimiento de este particular metabolismo energético que presentan los tumores, se ha podido desarrollar en la clínica la importante técnica de imagen de tomografía de emisión positrónica. Esta técnica permite medir aquellos tejidos con una alta tasa de consumo de glucosa, utilizando un análogo marcado radioactivamente con flúor, la  $^{18}\text{F}$ -fluorodesoxiglucosa, como marcador para diagnóstico y seguimiento de los tumores en el cuerpo humano (Almuhaideb, Papathanasiou, & Bomanji, 2011).



**Figura 1.5.** Diferencias energéticas entre la vía OXPHOS y la fermentación láctica (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009).

## 1.2.2 Metabolismo tumoral: causas y ventajas para la progresión tumoral

O. Warburg hipotetizó que este comportamiento de las células tumorales podría deberse a defectos en sus mitocondrias (Warburg, 1956b). Sin embargo, se ha demostrado que esto no es necesariamente cierto (Chance & Hess, 1959; Weinhouse, 1956) y que muchas células tumorales contienen mitocondrias totalmente funcionales (Koppenol, Bounds, & Dang, 2011). Si esto es así, ¿qué empuja a las células tumorales a favorecer este tipo de metabolismo energético?

### 1.2.2.1 Causas del efecto Warburg

Si bien es cierto que se han observado una gran variedad de mutaciones en mitocondrias de diversas células tumorales (Brandon, Baldi, & Wallace, 2006), estas variaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) no son las únicas capaces de causar esta remodelación del metabolismo energético. Algunos factores que se han asociado con el efecto Warburg son los siguientes:

**Hipoxia.** Tras la carcinogénesis, la mayor parte de los tumores se ven forzados a crecer en un microambiente poco vascularizado y, en consecuencia, hipóxico. Esta situación fuerza a las células a una adaptación metabólica para evitar utilizar la vía OXPHOS. Los factores inducibles por hipoxia (HIF's) son una familia de factores de transcripción que actúan bajo este tipo de situación (Ajdukovic, 2016). En condiciones normóxicas, el HIF-1 $\alpha$  es degradado tras su síntesis. Sin embargo, cuando la disponibilidad de oxígeno disminuye, su expresión se estabiliza y se transloca al núcleo, donde dimeriza con el HIF-1 $\beta$  para activar la expresión de varios genes como los relacionados con la neovascularización (VEGF y varios de sus receptores, como Flt-1, Ang-1 o Tie-

2) (Zimna & Kurpisz, 2015), y también con el metabolismo energético, en este caso la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) (Muñoz-Piñedo, El Mjiyad, & Ricci, 2012). Esta enzima promueve la glucólisis e inhibe la utilización del TCA y de la vía OXPHOS mediante la inhibición de la piruvato deshidrogenasa, que convierte el piruvato en acetil-coenzima A (acetil-CoA), paso previo al TCA.

Cabe puntualizar que no todos los tipos de tumores comienzan a crecer en ambientes hipóxicos. Hay varios de ellos que por su naturaleza pueden obtener oxígeno con facilidad, como es el caso de leucemias o el cáncer de pulmón (Vander Heiden et al., 2009); de hecho, como ya se ha comentado, el propio O. Warburg observó la inclinación de algunos tumores a realizar este metabolismo energético aun en presencia de oxígeno (Warburg, 1956a). Se ha observado que algunos tumores son capaces de mantener la activación constitutiva de HIF-1 $\alpha$  mediante la activación de ciertas rutas metabólicas o la acumulación de metabolitos específicos en la célula (Kaelin & Ratcliffe, 2008). Por tanto, parece que el empuje a la utilización de estas vías hipóxicas de señalización en las células tumorales podría producirse en mayor medida en respuesta a sus necesidades proliferativas que propiamente al microambiente hipóxico en el que crecen.

***Oncogenes y genes supresores de tumores.*** La vía de señalización de la PI3K/Akt, además de jugar un papel importante en la resistencia a la anoikis y en el fenotipo agresivo de los tumores, es una ruta proliferativa que también influye en el metabolismo energético de los mismos. El oncogén **Ras** es capaz de mediar la activación de esta ruta (Ramjaun & Downward, 2007), induciendo así la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT1), la actividad de la enzima glucolítica fosfofructoquinasa y la estabilidad de las hexoquinasas (Muñoz-Piñedo et al., 2012). Además, Ras también activa las rutas mediadas por las MAP quinasas (MAPK; *Mitogen-Activated Protein Kinases*) a través de mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), promoviendo el uso del TCA para la biosíntesis de ácidos grasos (Y. A. Yang, Han, Morin, Chrest, & Pizer, 2002).

Otro oncogén usualmente activo en los tumores es **c-MYC**. Su activación constitutiva conlleva también el aumento en la expresión de genes relacionados con la glucólisis aerobia, como la enzima lactato deshidrogenasa A (que convierte el piruvato en lactato) o GLUT1, además de fomentar también rutas anabólicas de aminoácidos y ácidos grasos (Stine, Walton, Altman, Hsieh, & Dang, 2015).

Respecto a los genes supresores de tumores, el más representativo de ellos y que además influye sobre el metabolismo energético es **p53**. Esta proteína es capaz de activarse para inhibir el proceso de tumorigénesis y promover la apoptosis de la célula a través de la detección de múltiples señales (Gottlieb & Vousden, 2010). Respecto al metabolismo energético, fomenta la

vía OXPHOS mediante la regulación de la subunidad II de la enzima citocromo c oxidasa (COXII), la activación transcripcional de la proteína de ensamblaje de la enzima citocromo c oxidasa (COX) y del factor de inducción de apoptosis (AIF) (Cheung & Vousden, 2010). Así pues, no es de extrañar que esta proteína se encuentre mutada, perdiendo su función, en muchos tumores, favoreciendo la evasión de la apoptosis y el efecto Warburg. A pesar de esto, también se ha descrito un rol de p53 en la promoción de la supervivencia de los tumores. Al parecer, si la señal de estrés que la activa es suave, la función continuada de p53 en este contexto sería la de favorecer el crecimiento y supervivencia de los tumores (Kruiswijk, Labuschagne, & Vousden, 2015).

***Mutaciones en las enzimas de la respiración aerobia.*** Finalmente, otra causa de la remodelación metabólica puede ser la mutación directa de enzimas o sistemas claves en el buen funcionamiento de la respiración aerobia. Los ejemplos más representativos son:

- Piruvato quinasa (PK) isozima 2 (**PKM2**). La enzima PK cataliza la última etapa de la glucólisis, convirtiendo el fosfoenolpiruvato en piruvato y produciendo ATP en el proceso. Tiene 4 isoformas, de las cuales la isoforma 2 (PKM2) es la que las células tumorales expresan en mayor medida, y es la única de ellas regulada alostéricamente (Christofk et al., 2008). Los tumores la expresan de forma preferente dado que esta isoforma les otorga la plasticidad metabólica para activar o inactivar su función dependiendo de la demanda energética. Al inactivar esta enzima, los metabolitos intermedios de la glucólisis se acumulan, pudiendo ser redirigidos a vías de síntesis de biomoléculas; y, cuando las células necesitan energía, pueden activar la PKM2 para obtener ATP (Dong et al., 2016).
- Isocitrato deshidrogenasa (**IDH**). En condiciones fisiológicas, tanto la IDH1 como la IDH2 catalizan la conversión de isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato, en el citoplasma y en la mitocondria (es una de las etapas del TCA), respectivamente. La mutación de estas enzimas provoca que su sustrato cambie al propio  $\alpha$ -cetoglutarato, convirtiéndolo en 2-hidroxiglutarato. Este producto, análogo estructural del  $\alpha$ -cetoglutarato, inhibe competitivamente a enzimas dependientes de  $\alpha$ -cetoglutarato, como la prolin hidroxilasa, cuya diana es el HIF-1 $\alpha$  para su degradación (Fujii, Khawaja, DiNardo, Atkins, & Janku, 2016). Por tanto, esta ganancia de actividad de las IDH1 e IDH2 promueve la estabilidad del HIF-1 $\alpha$  y, en consecuencia, el metabolismo glucolítico. En relación con esto, tanto el 2-hidroxiglutarato como el fumarato y el succinato (productos intermedios del TCA) son considerados como *oncometabolitos*, es decir, moléculas altamente expresadas en el cáncer que contribuyen no metabólicamente a cambios epigenéticos que favorecen los tumores (M. Yang, Soga, & Pollard, 2013).



- También se han descrito **mutaciones en el mtDNA** en los tumores, provocando así una disfunción de la vía OXPHOS. Estas observaciones concuerdan con la hipótesis inicial de O. Warburg (Brandon et al., 2006).

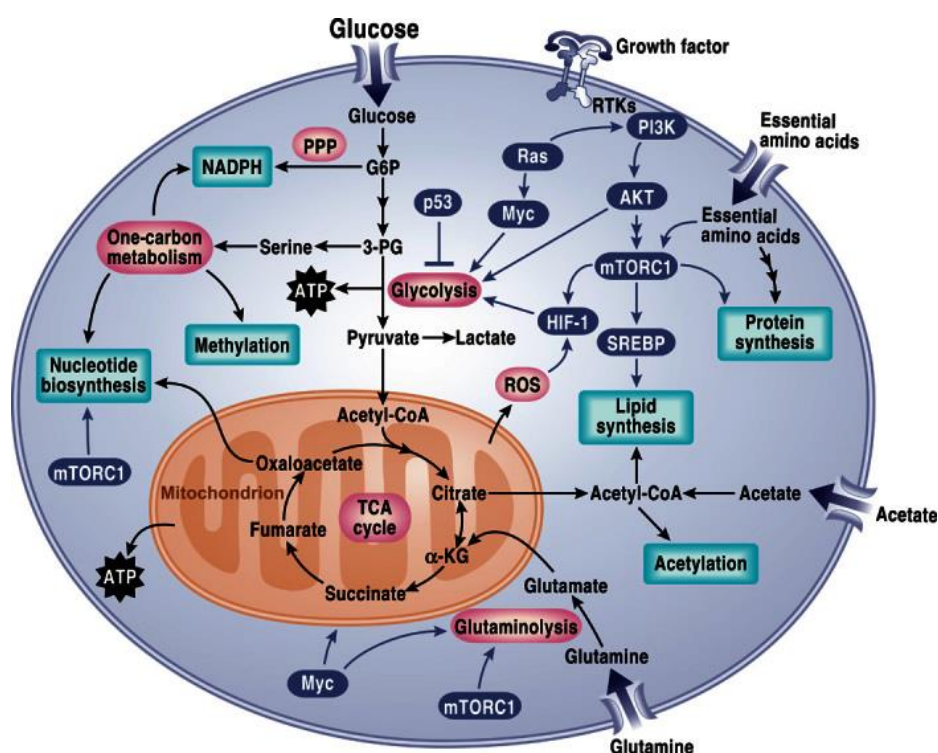
Más allá de las causas, este *fenotipo Warburg* desplegado por las células tumorales en su etapa inicial no es el único cambio metabólico que presentan, ni mantienen dicho metabolismo durante toda su trayectoria hacia la metástasis. Por tanto, es necesario diferenciar y comprender el porqué de este comportamiento en los dos estadios principales de progresión tumoral, así como las ventajas que ello les ofrece.

### ***1.2.2.2 Metabolismo tumoral en las etapas iniciales***

Las células tumorales utilizan con gran frecuencia la ruta de la glucólisis para obtener energía rápidamente. No obstante, ésta no es la única razón por la cual llevan a cabo esta ruta. Tras la carcinogénesis, las células tumorales recién formadas deben llevar a cabo la ***síntesis de biomoléculas*** en grandes cantidades para satisfacer su demanda proliferativa, y parte de los metabolitos intermedios de la glucólisis se utilizan para vías anabólicas (*Figura 1.6*).

Además de la alta captación de glucosa del entorno, otra molécula que las células tumorales internalizan en grandes cantidades es la glutamina (Reitzer, Wice, & Kennell, 1979). La captación de aminoácidos del entorno está estimulada por la activación del complejo 1 de mTOR (mTORC1) en los tumores (Laplane & Sabatini, 2012). Tras su internalización, y gracias principalmente a la acción de la enzima glutaminasa mitocondrial, la glutamina captada se transforma en glutamato, que sirve como base para que, por procesos de transaminación, se sinteticen la mayoría de **aminoácidos** no esenciales por transferencia del grupo amino del glutamato a diversos cetoácidos (DeBerardinis & Chandel, 2016).

El aporte de nitrógeno desde los aminoácidos captados del espacio extracelular es también necesario para la síntesis de **ácidos nucleicos**. Éstos necesitarán la acción coordinada tanto de esta captación de nitrógeno, como de otros dos factores. Por una parte, el uso de la glucosa-6-fosfato proveniente de la ruta glucolítica para, a través de la ruta de las pentosas fosfato, llevar a cabo la síntesis de ribosa y desoxirribosa. Por otra, el glutamato obtenido por la acción de la glutaminasa mitocondrial puede servir de varios pasos del TCA para transformarse en oxalacetato, que será transportado al citosol para que sirva de esqueleto carbonado de las purinas y pirimidinas.



**Figura 1.6.** Rutas de señalización afectadas alteradas en la síntesis de biomoléculas en las primeras etapas del cáncer (DeBerardinis & Chandel, 2016).

Finalmente, la síntesis de **lípidos**, regulada por el factor de transcripción **SREBP1** (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1*), que a su vez está regulado por **mTORC1** (Düvel et al., 2010), demanda la presencia de acetil-CoA en el citosol como unidad básica del esqueleto carbonado. Gran parte de este acetil-CoA suele provenir de la oxidación en la mitocondria del piruvato obtenido de la glucólisis, que deberá ser transportado en forma de citrato al citosol y reconvertido a acetil-CoA para su uso. Aun así, dado que parte de ese piruvato se derivará a lactato para la regeneración de  $\text{NAD}^+$ , las células cancerosas se sirven de otras fuentes para la obtención de acetil-CoA, como por ejemplo a través de la transformación reductora de la glutamina o del acetato (Metallo et al., 2011). Además de esto, es importante que el tumor posea

poder reductor en forma de NADPH para llevar a cabo las reacciones de biosíntesis que proviene mayoritariamente de la ruta de las pentosas fosfato (Pavlova & Thompson, 2016).

Otra característica importante del metabolismo tumoral es la *modulación del TME*. Las células neoplásicas, a través de la secreción de diversos factores, son capaces de alterar la composición del estroma que les rodea para su beneficio. De hecho, se ha observado que varios tipos celulares genéticamente estables que residen alrededor del tumor o acuden a él, tales como los fibroblastos asociados al tumor (CAF), células endoteliales y diversos componentes del SI, sufren cambios fenotípicos tras la exposición a estos factores (Hanahan & Coussens, 2012). Si bien todavía no se conocen con exactitud las estrategias que llevan a cabo los tumores en esta modulación, sí se sabe que en la misma participan los factores de crecimiento, las interacciones célula-célula o las alteraciones de la ECM (Pavlova & Thompson, 2016).

Una molécula derivada del metabolismo propio de los tumores y que modula el TME es el *lactato*. El lactato se produce en grandes cantidades en los tumores tras la fermentación del piruvato. Seguidamente, éste es exportado al exterior celular a través del transportador monocarboxilato 4 (MCT-4), que co-transporta H<sup>+</sup> con el lactato, promoviendo así la acidificación del TME. La presencia de ambos metabolitos favorece la capacidad invasiva de los tumores (Dhup, Dadhich, Porporato, & Sonveaux, 2012), así como la de producir cambios en las células del SI que acuden al estroma (Fischer et al., 2007), como se explicará en los *Apartados 1.2.2.3 y 1.4.4.3*.

Por último, sin abandonar la modulación del TME, es importante recalcar la heterogeneidad de las células tumorales dentro del mismo tumor. Si bien es cierto que, a modo general, las células cancerosas exhiben un *fenotipo Warburg*, esto no significa que todas las células del parénquima desplieguen exactamente el mismo metabolismo energético. Como se ha comentado con anterioridad, los tumores poseen cierta plasticidad metabólica que les permite adecuarse a la disponibilidad de nutrientes del entorno y de las células estromales circundantes. Además, algunas células se sitúan hacia el interior de la masa tumoral mientras que otras están más expuestas al estroma. Se ha observado que las células que están en el “núcleo” del tumor tienen menor acceso a nutrientes y a oxígeno, lo que les induce a realizar la fermentación láctica. Sin embargo, las orientadas hacia el estroma tienden a utilizar la vía OXPHOS con mayor frecuencia (M. Lee & Yoon, 2015).

Parte de esto puede ser por la mayor disponibilidad de nutrientes. No obstante, también se ha descrito un mecanismo de interacción con el estroma que puede explicarlo. Las células tumorales, a través de la secreción de ROS al estroma, pueden modular a los CAF's que les rodean, empujándoles a la producción de lactato (vía estabilización del HIF-1 $\alpha$  y activación de NF- $\kappa$ B)

(Pavlidis et al., 2009). Este lactato es internalizado posteriormente por las células tumorales en contacto con el TME, que podrán derivarlo a piruvato (a través de la enzima lactato deshidrogenasa B) y obtener energía a través de OXPHOS. Este mecanismo es conocido como el **efecto Warburg reverso** (Pavlidis et al., 2009). Puede haber dos razones por la que estas células tumorales en la superficie del tumor obtienen energía por la vía OXPHOS: uno, por la mayor disponibilidad de oxígeno respecto a las células del “núcleo” tumoral, y dos, para evitar una excesiva acidificación del TME, que sería nociva también para el tumor (Koukourakis, Giatromanolaki, Harris, & Sivridis, 2006).

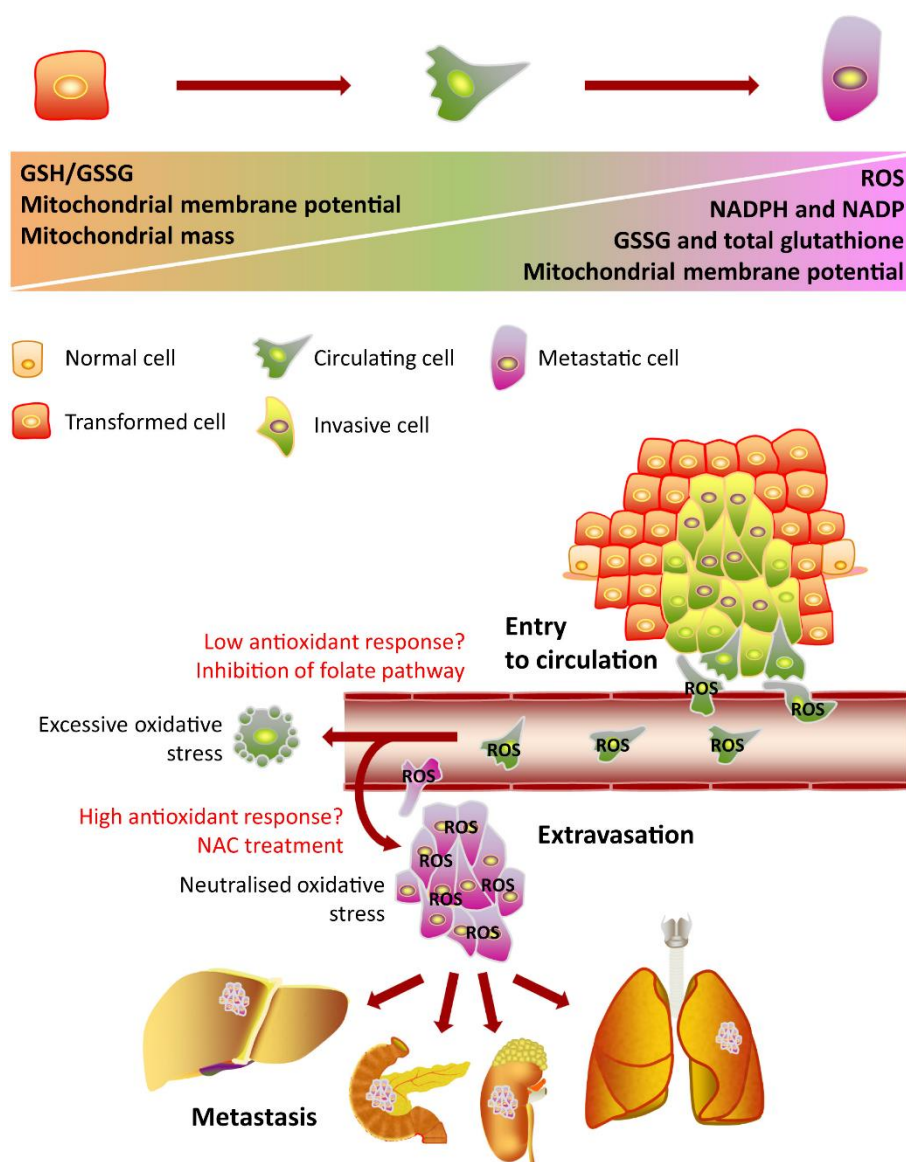
### 1.2.2.3 *Metabolismo tumoral en la progresión y metástasis tumoral*

Todo lo mencionado en el apartado anterior hace referencia a las características metabólicas de los tumores recién formados. Todas ellas son propiedades que les permite comenzar a proliferar en el hostil ambiente que encuentran. A pesar de ello, el cáncer es una enfermedad dinámica, y los tumores formados irán readaptando su metabolismo para aumentar su malignidad y poder metastatizar, ganando nuevas funciones, perdiendo otras y readaptando las que ya poseían. Parte de los cambios metabólicos que sufren estas células ya se han cubierto al hablar de los pasos necesarios en los procesos de EMT y MET, pero también hay adaptaciones metabólicas que se comentarán a continuación.

Las células con potencial metastásico poseen una alta tasa proliferativa, por lo que sus **rutas anabólicas** para la síntesis de biomoléculas también se encuentran aumentadas. Una de estas rutas es la síntesis de **aminoácidos** (Paolo E. Porporato, Payen, Baselet, & Sonveaux, 2016). Se ha observado que la inhibición de la glutaminasa disminuye la capacidad invasiva de los tumores (J. B. Wang et al., 2010). Además, la enzima glutamato deshidrogenasa se encuentra sobreexpresada en metástasis de vesícula biliar (J. W. Wang et al., 2009) y en hepatocarcinoma murino (S. Liu et al., 2008). Respecto al **metabolismo lipídico**, los datos generales indican un gran aumento de las enzimas esenciales para la síntesis *de novo*, tanto la ATP-citrato liasa como la ácido graso sintasa, en múltiples tipos de cáncer (Paolo E. Porporato et al., 2016). Por último, otra ruta anabólica aumentada es la **ruta de las pentosas fosfato**. De hecho, se ha demostrado que la inhibición o falta de actividad de algunas de las enzimas que participan en esta ruta metabólica reduce la capacidad metastásica de ciertos tipos de tumores (Payen, Porporato, Baselet, & Sonveaux, 2016). Hay dos razones por las que las células con fenotipo invasivo utilizan la ruta de las pentosas fosfato. La primera, y más evidente, para la síntesis de ácidos nucleicos. La segunda, para generar el NADPH como estrategia para combatir los ROS que se generan (Pandolfi et al., 1995), como se expondrá a continuación.

Durante la progresión tumoral y la metástasis, la **secreción de lactato** y la **variación del pH** son otros factores que promueven la malignidad del tumor. De hecho, el incremento de los niveles de lactato se correlaciona con mayor recurrencia en los tumores y mayor probabilidad de metástasis (Doherty & Cleveland, 2013). La exportación del lactato al exterior celular, a través principalmente del transportador MCT-4, demanda también el bombeo de  $H^+$ , contribuyendo a la disminución del pH extracelular. La hidrólisis del ATP, así como la salida del  $CO_2$  producido por OXPHOS, la ruta de las pentosas fosfato o la glutaminólisis también contribuye a la acidificación del exterior celular (Swietach, Vaughan-Jones, & Harris, 2007). En cualquier caso, la bajada del pH extracelular contribuye a la progresión tumoral a través de múltiples mecanismos, como la vascularización por inducción de la expresión de VEGF (Shi et al., 2001), la activación de enzimas proteolíticas de la ECM (Kato et al., 2007) o catepsina B (Rozhin, Sameni, Ziegler, & Sloane, 1994) así como la inhibición de la acción del SI contra el tumor (Calcinotto et al., 2012).

Se cree que el **balance redox** en la metástasis es un aspecto fundamental para que ésta tenga éxito. Cuando las células tumorales sufren el proceso de EMT, el proceso de desadherencia de la matriz les genera un estrés oxidativo que normalmente produce la muerte celular. Por tanto, además de desarrollar mecanismos de defensa frente a los ROS en las primeras etapas de progresión, éstos se deben potenciar especialmente durante el proceso metastásico (Piskounova et al., 2015) (*Figura 1.7*). Una de las maneras principales que tienen los tumores metastásicos de regular la generación excesiva de ROS es aumentando la producción de NADPH, cofactor de varias enzimas que neutralizan los ROS celulares (Vander Heiden & DeBerardinis, 2017). En el citosol, la producción de NADPH proviene mayoritariamente de la ruta de las pentosas fosfato (Pandolfi et al., 1995), mientras que, tanto en el citosol como en la mitocondria, la conversión de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato por parte de la IDH1 regenera el NADPH necesario para evitar los daños del ROS citosólico y mitocondrial (Jiang et al., 2016). Esta homeostasis del NADPH vendría regulada por la activación de la AMPK bajo estas circunstancias de estrés energético (Jeon, Chandel, & Hay, 2012). Adicionalmente, también se ha observado un aumento en los niveles de varias de las enzimas que participan en la retirada de los ROS, como la glutatión peroxidasa (Gorrini, Harris, & Mak, 2013), la peroxirredoxina 2 (Stresing et al., 2013) o la MnSOD (Kamarajugadda et al., 2013). Por tanto, el uso de agentes que inhiban a las enzimas antioxidantes podría ser una alternativa para tratar de detener el proceso metastásico.



**Figura 1.7.** Respuesta de las células tumorales a los ROS producidos durante la progresión tumoral. Modificado de (Peiris-Pagès, Martínez-Outschoorn, Sotgía, & Lisanti, 2015).

La **remodelación del metabolismo energético** durante la metástasis es otra característica estudiada a la par que controvertida. Como se ha explicado en el apartado anterior y, de modo general, las células tumorales tienden a consumir grandes cantidades de glucosa, que derivan a lactato en detrimento de la vía OXPHOS para producir energía. Esto no significa que estos tumores sean incapaces de realizar la respiración celular o que no la hagan bajo según qué contextos (Fu et al., 2017). Respecto a la metástasis, el consenso general es que el proceso de desadherencia durante la EMT provoca en las células tumorales una deficiencia energética que deben mitigar. Ahora bien, la pregunta que surge es si las células metastásicas tienden a realizar la glucólisis aerobia o más bien la vía OXPHOS para obtener energía. Hay evidencias en ambos sentidos:

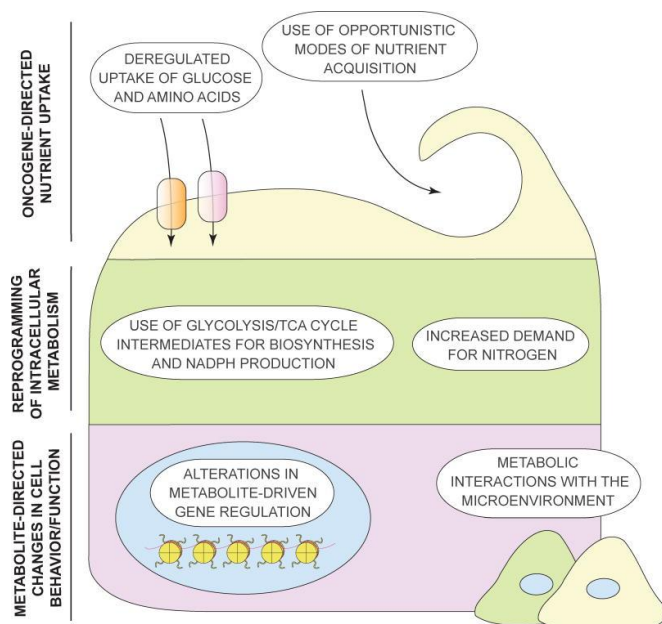
- **Pro-Warburg.** Por una parte, se ha demostrado que un mayor fenotipo glucolítico favorece la agresividad de los tumores y su capacidad metastásica (Lu, Tan, & Cai, 2015). De hecho, una característica generalmente aceptada de las macrometástasis es la alta captación de glucosa (W. Duan et al., 2014). Los tumores son capaces de aumentar la expresión de las PDK's, inhibiendo de esta manera la vía OXPHOS y mejorando la resistencia a la anoikis (Kamarajugadda et al., 2012). También se ha observado que el uso de la vía glucolítica en otras células evita la formación de ROS en la mitocondria (Brand & Hermfisse, 1997), con lo cual ésta podría ser una estrategia de los tumores para evitar los ROS generados por el proceso de desadherencia. Otro grupo de investigación ha correlacionado la disminución de la biogénesis mitocondrial (a través de PCG-1 $\alpha$ , *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Co-Activator 1 $\alpha$* ) con mayor inducción de metástasis en cáncer de próstata (Torrano et al., 2016). Además de todo esto, numerosos estudios han correlacionado defectos en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (mETC) con mayor potencial metastásico como, por ejemplo, (Ishikawa et al., 2008).
- **Anti-Warburg.** Por otro lado, varios grupos de investigación sí han observado un aumento de la respiración celular en células metastásicas. El aumento de PCG-1 $\alpha$  promueve la vía OXPHOS en células metastásicas en melanoma y cáncer de mama (LeBleu et al., 2014). Igualmente, para evitar el proceso de anoikis durante la EMT, las células de cáncer de ovario incrementan el metabolismo energético mitocondrial a través de un aumento en la captación de piruvato (Caneba, Bellance, Yang, Pabst, & Nagrath, 2012). También se ha observado el efecto Warburg reverso en células metastásicas de cáncer de mama (Sotgia et al., 2012).

Los procesos de progresión tumoral y metástasis son eventos que, debido a la cantidad de pasos necesarios para que sucedan, pueden variar o presentar diferencias fenotípicas entre cada uno de ellos, incluso dentro de la propia neoplasia. Por todo lo comentado hasta ahora, parece que, a nivel de metabolismo energético, puede existir la misma heterogeneidad, ya no sólo por las necesidades energéticas en cada paso de la progresión hacia la metástasis, sino también por el tipo celular o/y las lesiones genéticas que éstos presenten (Yuneva et al., 2012). Así pues, respecto a si el fenotipo Warburg se acentúa o no en células metastásicas, es prudente admitir que ambas caras de la moneda pueden ser válidas, en función del contexto. Como punto en común entre ambos fenotipos, se puede decir que, para ambos, se genera una estrategia para mitigar los ROS inducidos por el proceso de desadherencia. Si dicha célula es capaz de soportarlos,

este estrés oxidativo generará en ella una respuesta proliferativa (R. K. Singh et al., 2014) que favorecerá la metástasis.

### 1.2.3 Terapia anti-tumoral con fármacos metabólicos

Si algo positivo podía tener la existencia de tantas alteraciones metabólicas en el cáncer, es que también implica un gran abanico de posibilidades de desarrollar fármacos que inhiban alguna de estas rutas alteradas en él (*Figura 1.8*). En este apartado se subrayarán aquellas dianas más estudiadas, incidiendo especialmente en los fármacos que alteran el metabolismo de la glucosa y la respiración celular.



**Figura 1.8.** Esquema de posibles dianas terapéuticas del metabolismo tumoral (Pavlova & Thompson, 2016).

#### 1.2.3.1 Alteración del metabolismo de los ácidos grasos

Los esfuerzos en este campo se han centrado principalmente en el bloqueo de la síntesis de ácidos grasos, con inhibidores de las enzimas acetil-CoA carboxilasa, ATP-citrato liasa y, sobre todo, ácido graso sintasa (Luengo, Gui, & Vander Heiden, 2017), de momento en fase pre-clínica. Entre los inhibidores de ácido graso sintasa se incluyen Orlistat (Carvalho et al., 2008), C93 (Orita et al., 2007) o TVB-3166 y TVB-3664 (Heuer et al., 2017), siendo ésta la enzima que parece tener un mayor futuro en la clínica (Flavin, Peluso, Nguyen, & Loda, 2010). De las otras dos enzimas, también se han desarrollado otros fármacos inhibitorios, tales como SB-204990 para la ATP-citrato liasa (Hatzivassiliou et al., 2005) o ND-646 para la acetil-CoA carboxilasa (Svensson et al., 2016).



### 1.2.3.2 *Alteración del metabolismo de los nucleótidos*

Durante parte del siglo XX y hasta el día de hoy, se llevan utilizando en la clínica, como agentes quimioterapéuticos, un grupo de compuestos conocidos como *antimetabolitos* que, a través de distintos mecanismos, interfieren con la síntesis de DNA y RNA (Muñoz-Piñedo et al., 2012). La diana más común es la síntesis de timidilato, aunque la inhibición de otras rutas, como la síntesis de folato, de la ruta de las pentosas fosfato o de algunos aminoácidos también afectan indirectamente al metabolismo de los nucleótidos (Martínez-Outschoorn, Peiris-Pagès, Pestell, Sotgia, & Lisanti, 2017). Antimetabolitos como la aminopterina y el metotrexato (inhibidores de la síntesis de folato), tiopurinas (análogos de purinas) o el 5-fluorouracilo (análogo de pirimidinas) se han usado ampliamente durante décadas en el tratamiento del cáncer (DeVita & Chu, 2008). A pesar de ello, estos fármacos no sólo afectan a las células tumorales, sino que también interfieren en la hematopoyesis y en otras células sanas de rápida división del organismo. Nuevos compuestos se siguen desarrollando para mejorar la selectividad de los antimetabolitos, así como posibles terapias combinadas que rebajen la toxicidad global de éstos (Peters, 2014).

### 1.2.3.3 *Alteración del metabolismo de los aminoácidos*

Debido a la alta dependencia de los tumores de la captación de glutamina del entorno (Eagle, 1955), el metabolismo de este aminoácido es una de las vías que se investiga como tratamiento contra el cáncer. De hecho, la falta de glutamina es capaz de sensibilizar a los tumores a la muerte inducida a través de la vía extrínseca de la apoptosis (Mauro-Lizcano & López-Rivas, 2018). La estrategia más frecuente consiste en el uso de inhibidores de la glutaminasa, con buenos resultados *in vitro* e *in vivo*, si bien se duda de su eficacia en clínica debido a que también se han observado efectos anti-tumorales de la glutaminasa (Luengo et al., 2017). Otra diana metabólica es el metabolismo de la serina, cuya biosíntesis se encuentra generalmente aumentada en el cáncer (Mattaini, Sullivan, & Vander Heiden, 2016). La enzima de esta ruta cuya inhibición suscita más interés es la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa. Su expresión se encuentra aumentada de forma recurrente en los tumores y su inhibición parece disminuir la proliferación tumoral (Locasale et al., 2011). Por último, otro caso concreto es el de la asparagina, cuya síntesis se produce en muchos tipos celulares, pero no en la leucemia linfoblástica aguda (Neuman & McCoy, 1956). Esta *auxotrofia* en este tipo de cáncer ha permitido desarrollar el uso de la enzima L-asparaginasa, que metaboliza la asparagina en ácido aspártico, como tratamiento estándar contra este cáncer (Egler, Ahuja, & Matloub, 2016).

#### **1.2.3.4 Alteración del metabolismo regulado por factores de transcripción**

Como se ha explicado en apartados anteriores, ciertos factores de transcripción que se encuentran anormalmente activos en el cáncer influyen sobre el metabolismo de los tumores. De aquellos, los que más se han considerado como diana de tratamientos son HIF-1 y c-MYC. La estabilización del monómero HIF-1 $\alpha$  promueve el efecto Warburg en los tumores, además de la neovascularización a través de la expresión de VEGF (Zimna & Kurpisz, 2015). Varios ensayos clínicos se han realizado utilizando distintos inhibidores de HIF-1, con buenos resultados iniciales (Martínez-Outschoorn et al., 2017), aunque lamentablemente algunos de ellos se han detenido por problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos (Talekar, Boreddy, Singh, & Amiji, 2014). Respecto a c-MYC, es un oncogén que fomenta la glucólisis aerobia, además de la síntesis de biomoléculas (Stine et al., 2015). No obstante, su inhibición como tratamiento aún está en fase experimental, debido a que su disminución también se ha demostrado tener efectos positivos para el tumor (Valencia et al., 2014), además de ser complicado de inhibir de forma específica (Martínez-Outschoorn et al., 2017).

#### **1.2.3.5 Alteración del balance redox**

La producción de ROS aumenta en varias de las etapas de progresión tumoral, causa por la cual las células cancerosas deben desarrollar varios mecanismos de defensa para evitar el daño celular (ver *Apartado 1.2.2.3*). Por consiguiente, varias estrategias se han utilizado para reducir la acción de estos agentes antioxidantes. Hay actualmente dos vías principales en desarrollo. Una de ellas consiste en la inhibición del factor nuclear tipo 2 (NRF2). NRF2 disminuye el estrés oxidativo a través varios mecanismos (Menegon, Columbano, & Giordano, 2016), y su inhibición resulta en la disminución de la *tumorigénesis in vivo* (DeNicola et al., 2011). La otra vía de investigación se centra en el metabolismo del glutatión. Como se ha comentado con anterioridad, la glutatión peroxidasa es una enzima dependiente de NADPH que puede detoxificar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua, convirtiendo a su vez el glutatión reducido (GSH) en oxidado (GSSG). Para poder seguir detoxificando, el GSSG es reducido de vuelta a GSH, con el gasto total de un equivalente de NADPH. Varias estrategias se están utilizando para reducir la cantidad de GSH en los tumores, como la inhibición genética o farmacológica de la síntesis de GSH o el uso de vitamina C, que consume GSH en la célula y la puede hacer más vulnerable a los ROS (Traverso et al., 2013).

### **1.2.3.6 Alteración del metabolismo de la glucosa y la vía OXPHOS**

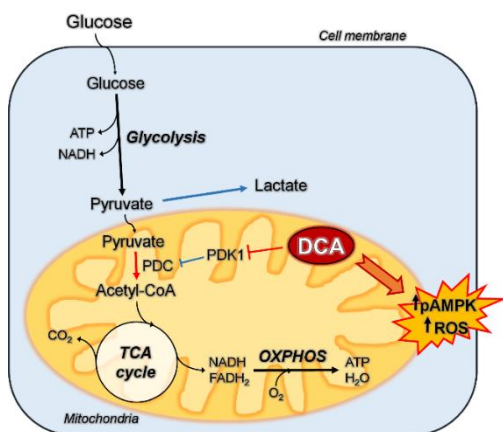
A nivel farmacológico, el estudio del metabolismo energético ha sido y es uno de los que más interés genera. A continuación, se mostrarán varios ejemplos de los fármacos o vías metabólicas más estudiadas, haciendo especial hincapié en el dicloroacetato (DCA) y la metformina.

**2-deoxiglucosa (2-DG).** Una de las etapas limitantes en la glucólisis es el primer paso, en el que se produce la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato, proceso catalizado por la enzima hexoquinasa. Concretamente, la isoforma 2 se encuentra usualmente sobreexpresada en varios tipos de tumor (Wu, Hu, Wu, Zou, & He, 2017). La forma más estudiada de inhibir esta enzima es mediante el uso del fármaco metabólico 2-deoxiglucosa (2-DG). La 2-DG es un análogo de la glucosa, que al ser fosforilado por la hexoquinasa, se convierte en 2-deoxiglucosa-6-fosfato, no pudiendo ser metabolizado por las células e inhibiendo competitivamente a la hexoquinasa. Sin embargo, aunque los estudios iniciales con este fármaco en pacientes dieron buenas respuestas, éstos se tuvieron que abandonar debido a su toxicidad (Landau, Laszlo, Stengle, & Burk, 1958). En los últimos años, se han hecho varios esfuerzos por retomar el uso de la 2-DG en ensayo clínicos a dosis más bajas, pero sus efectos en el tumor son menores (Raez et al., 2013).

**Inhibición de la producción de lactato.** Los procesos energéticos que suceden en la glucólisis aerobia finalizan con la fermentación del piruvato a lactato, metabolito que es exportado a la ECM y que es indicador de mal pronóstico en los tumores (Doherty & Cleveland, 2013). Dos formas principales para evitar su acción se han investigado: a través de la inhibición de la lactato deshidrogenasa A y de los transportadores que regulan su importación y exportación. Respecto a la primera, si bien todavía queda por conocer en profundidad el efecto de la inhibición de la lactato deshidrogenasa A, varios estudios preclínicos han dado buenos resultados (Feng et al., 2018). En cuanto a la inhibición de MCT-4, su posible efecto anti-tumoral se encuentra aún en fases de desarrollo clínico (Polanski et al., 2014).

**Inhibición de IDH y 2-hidroxiglutarato.** Como se ha comentado en el *Apartado 1.2.2.1*, la ganancia de función de IDH1 e IDH2 en los tumores favorece el fenotipo glucolítico a través de la formación de 2-hidroxiglutarato, un conocido oncometabolito (Fujii et al., 2016). Varios inhibidores de las IDH se han desarrollado y llevado a la clínica, con repuestas positivas en pacientes con tumores hematológicos que expresan mutaciones en estas enzimas (Dang, Yen, & Attar, 2016), aunque no son tan efectivos en modelos de glioma (Tateishi et al., 2015).

**Dicloroacetato (DCA).** Este fármaco es un análogo estructural del piruvato, cuyo efecto es la inhibición de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) (*Figura 1.9*). Debido a esto, la PDK no puede inhibir a la piruvato deshidrogenasa y, por tanto, ésta permanece activa, forzando al piruvato proveniente de forma mayoritaria de la glucólisis a convertirse en acetil-CoA. De esta manera, se reactiva la vía OXPHOS y se inhibe la producción de lactato.



**Figura 1.9.** Mecanismo intracelular de acción del DCA en las células. Las flechas azules indican una potenciación de las rutas que señalan, mientras que las rojas implican un bloqueo de la misma.

El DCA es un fármaco que se utiliza desde hace décadas (Whitehouse, Cooper, & Randle, 1974). Debido a su capacidad de disminuir los niveles de lactato, se usaba en la clínica como tratamiento para la acidosis láctica tanto congénita como adquirida (James et al., 2017; Stacpoole, Lorenz, Thomas, & Harman, 1988). Los resultados de este tratamiento son variables, en función de la causa de dicha acidosis láctica, mostrando buenas respuestas en pacientes con deficiencias en la piruvato deshidrogenasa (Abdelmalak et al., 2013; Stacpoole, Kurtz, Han, & Langaee, 2008). Sin embargo, también se observaron problemas de toxicidad en forma de neuropatía periférica en pacientes con enfermedades mitocondriales primarias (Kaufmann et al., 2006). Se están llevando a cabo estudios clínicos para establecer los casos de acidosis láctica en los que este fármaco es efectivo (James & Stacpoole, 2016). También se está ensayando la dosis óptima a utilizar (Jahn et al., 2016; Langaee et al., 2018). Se ha estudiado asimismo su uso en otras enfermedades, como diabetes tipo 2 (Stacpoole, Moore, & Kornhauser, 1978), hipertensión arterial pulmonar (Michelakis et al., 2017) o sepsis (McCall et al., 2018).

Su capacidad de reducir la producción de lactato, y por tanto la de revertir el fenotipo Warburg, ha suscitado su interés en su uso como agente anti-tumoral (Michelakis, Webster, & Mackey, 2008). La eficacia en solitario del DCA se ha probado en variados tipos de tumores en modelos murinos: pulmón, glioblastoma y mama (Bonnet et al., 2007), endometrio (Wong, Huggins, Debidda, Munshi, & De Vivo, 2008), colorrectal (Delaney et al., 2015; Lin et al., 2014; Madhok, Yeluri, Perry, Hughes, & Jayne, 2010), mama (R. C. Sun et al., 2010), carcinoma cervical

(D. Liu et al., 2012), neuroblastoma (Vella, Conti, Tasso, Cancedda, & Pagano, 2012), glioma (Y. Duan et al., 2013), carcinoma pulmonar de Lewis (Kolesnik et al., 2015), carcinoma renal (Kinnaird et al., 2016), e incluso en tumores caninos de próstata (T. Harting et al., 2016) y mama (T. P. Harting et al., 2017). El DCA es capaz de inducir directamente apoptosis en aquellos tumores con defectos en la mETC a través de la generación de ROS en la mitocondria (Stockwin et al., 2010). Sin embargo, salvo otros casos muy concretos o a dosis muy elevadas, su efecto general en otros tipos de tumores es más bien anti-proliferativo y no tanto citotóxico.

Varios ensayos clínicos en fase 1 se han llevado a cabo para evaluar su seguridad en varios tipos de tumores: cáncer cerebral (Dunbar et al., 2014), cáncer de pulmón de células grandes (NSCLC) (Garon et al., 2014) y tumores sólidos (Chu et al., 2015), con buenos resultados en general, aunque con inducción en algunos casos de neuropatía periférica, reversible tras disminución o retirada del fármaco. Otros ensayos clínicos de tratamiento con DCA en pacientes han terminado en resultados dispares, con disminución de la masa tumoral en carcinoma de tiroides (D. Flavin, 2010), remisión total en linfoma no Hodgkin (D. F. Flavin, 2010), disminución de la masa tumoral y estabilización en cáncer de colon en fase 4 (Khan, Andrews, & Blackburn, 2016) y en melanoma metastásico (Khan, Andrews, Shainhouse, & Blackburn, 2017), pero también toxicidad neuropática en otro paciente con melanoma metastásico (Brandsma, Dorlo, Haanen, Beijnen, & Boogerd, 2010). A juzgar por los resultados generales, su efecto, así como su toxicidad puede ser dependiente de las características del tumor, así como de la capacidad de cada paciente de metabolizar el fármaco (Jahn et al., 2016).

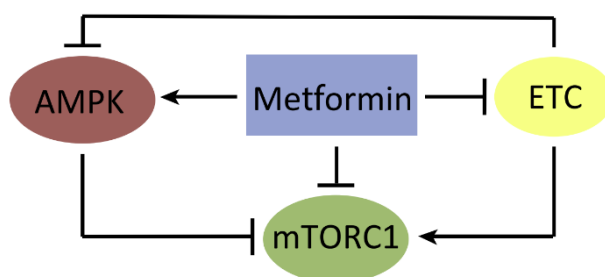
El hecho de restaurar la vía OXPHOS y evitar la producción de lactato repercute en una remodelación completa del metabolismo energético de los tumores. El mecanismo molecular de acción del DCA no está todavía completamente caracterizado. No obstante, como ya se ha comentado durante esta Introducción, el cambio en la forma de obtener energía induce cambios epigenéticos en la célula como, por ejemplo, a través de la activación de la enzima AMPK, que puede activar entre otros a p53 y así modular la expresión de múltiples dianas (Villalba et al., 2014) (Allende-Vega et al., 2015). Además, la restauración del uso de la mitocondria para este proceso puede, entre otras cosas, promover la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (Bonnet et al., 2007). Debido a estos efectos anti-tumorales del DCA, se está estudiando combinarlo con otros fármacos. Varios de estos estudios se han probado en células de pacientes, combinando el DCA con omeprazol y tamoxifeno en un paciente de colangiocarcinoma (Ishiguro, Ishiguro, Ishiguro, & Iwai, 2012) y en muestras *ex vivo* con metformina en leucemia linfocítica crónica de tipo B (B-CLL) (Voltan, Rimondi, Melloni, Gilli, et al., 2016) y con doxorrubicina o vincristina en B-CLL y linfoma de células B (Allende-Vega et al., 2015).

Por tanto, el DCA es en general un fármaco con propiedades prometedoras para su uso contra el cáncer, especialmente en tumores con defectos en el metabolismo de la glucosa, o como agente sensibilizador para potenciar la acción anti-tumoral de otros fármacos.

**Metformina.** La metformina es un fármaco de la familia de las biguanidas. Es ampliamente conocido por utilizarse como tratamiento para la diabetes tipo 2, gracias a su efecto en la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado y en el aumento de la captación de glucosa mediada por la insulina en el músculo esquelético (Pernicova & Korbonits, 2014). El interés del uso de la metformina como tratamiento contra el cáncer radica en que se ha observado una menor incidencia de cáncer en aquellos pacientes de diabetes tipo 2 que se trataban con este fármaco (Evans, Donnelly, Emslie-Smith, Alessi, & Morris, 2005). Desde entonces, varios ensayos clínicos se han realizado sobre pacientes no diabéticos con cáncer con algunos resultados alentadores (Vancura, Bu, Bhagwat, Zeng, & Vancurova, 2018).

A nivel molecular, la metformina inhibe al complejo I de la mETC. No obstante, todavía quedan aspectos de su mecanismo de acción por elucidar. Lo que sí se sabe es que:

- La metformina entra al interior celular a través del transportador 1 de catión orgánico (OCT1) y se acumula en la matriz mitocondrial. Una vez allí, inhibe moderadamente al complejo I de la mETC (El-Mir et al., 2000). De hecho, mientras que la rotenona induce un aumento en ROS, se ha observado que la metformina los disminuye significativamente (Batandier et al., 2006).
- Como consecuencia de la inhibición parcial de la vía OXPHOS, disminuye la producción de ATP y el ratio AMP/ATP aumenta, forzando así la activación de la AMPK (*Figura 1.10*).



**Figura 1.10.** Dianas intracelulares principales de la metformina (Vancura et al., 2018)

A partir de ahí, la AMPK es capaz de regular varias vías metabólicas, entre ellas principalmente inhibe la vía de mTOR (mTORC1), lo cual genera la inhibición de vías anabólicas (síntesis de lípidos, proteínas, glucosa) y, por ende, la proliferación y supervivencia de la célula.

Otras vías o factores que regula la AMPK son p53, la vía PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B o c-MYC (Faubert, Vincent, Poffenberger, & Jones, 2015).

Se ha demostrado que la metformina también inhibe a la glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa mitocondrial, enzima necesaria para la gluconeogénesis a partir del glicerol y que además aporta electrones a la mETC (Madiraju et al., 2014). De hecho, se ha visto que la metformina puede inhibir la síntesis de glucosa sin necesidad de AMPK o LKB1 (quinasa que actúa fosforilando y activando a AMPK) (Foretz, Guigas, Bertrand, Pollak, & Viollet, 2014). Por tanto, no está del todo clara la dependencia o no de AMPK para que la metformina ejerza su función, y se están destinando esfuerzos en la actualidad para dilucidar su mecanismo exacto de inhibición en los tumores.

En cualquier caso, su efecto anti-tumoral ha sido comprobado en multitud de ensayos y, de hecho, se encuentra actualmente en estudios clínicos para el tratamiento de varios tipos de cáncer (Vancura et al., 2018). Asimismo, su posible efecto combinatorio con otros fármacos contra diversos tipos de tumor también se está investigando, tanto en combinación con el DCA (Voltan, Rimondi, Melloni, Gilli, et al., 2016) como con numerosos fármacos de quimioterapia (H. Zhang & Guo, 2016).

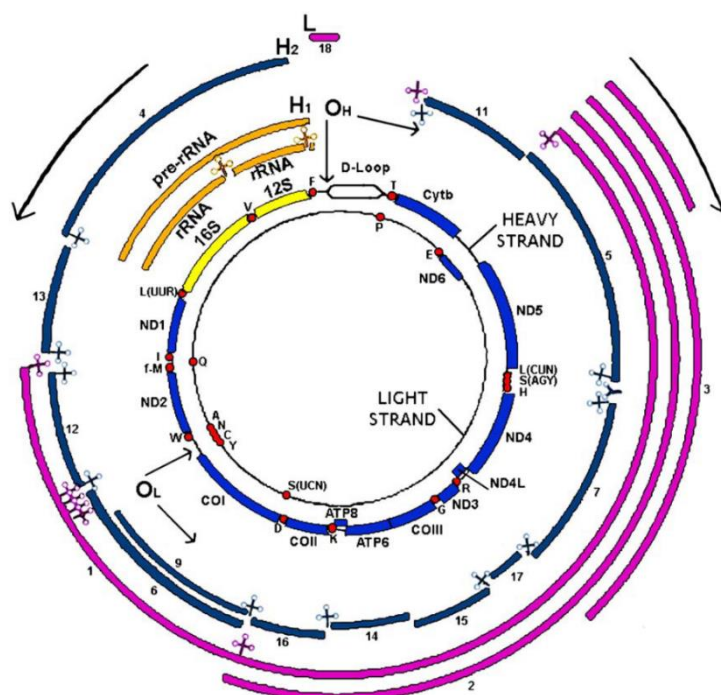
## 1.3 MITOCONDRIA Y CÁNCER

### 1.3.1 Características y funciones fisiológicas de la mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares cuya misión más destacada es la de **suministrar energía** a la célula en forma de ATP, razón por la que también son conocidas como *“las centrales energéticas de la célula”*. Además de esto, participan en otras tareas importantes, como la síntesis de biomoléculas, la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , la regulación de la autofagia y de la vía intrínseca de la apoptosis. Las mitocondrias poseen una **doble membrana**, llamadas membrana mitocondrial externa (OMM) e interna (IMM), a través de las cuales se lleva a cabo el tráfico continuo de metabolitos en ambos sentidos. Esta doble membrana implica la existencia de dos compartimentos internos en la mitocondria, que cumplen funciones fisiológicas distintas: la matriz mitocondrial (interior de la IMM) y el espacio intermembrana. Morfológicamente, la IMM posee numerosos pliegues o *crestas*, cuya finalidad es maximizar la superficie disponible (Montoya, 2010).

Las mitocondrias provienen de  $\alpha$ -proteobacterias que fueron endocitadas por un organismo eucariota ancestral, comenzando a vivir en endosimbiosis desde entonces (Nunnari & Suomalainen, 2012). De hecho, las mitocondrias se encuentran en prácticamente todos los

organismos eucariotas (Cavalier-Smith, 1987). Debido a esta endosimbiosis, y a lo largo de la evolución, el material genético de aquellas mitocondrias ancestrales fue migrando e integrándose en el DNA del organismo eucariota, quedando solamente en ellas genes asociados a producción de energía. Por tanto, las mitocondrias, además del núcleo, son los únicos orgánulos celulares en la célula animal que poseen su **propio material genético, el DNA mitocondrial o mtDNA** (Figura 1.11). Además de poseer múltiples copias del mismo en cada mitocondria, el mtDNA es circular y de doble cadena y, en humanos, contiene 16569 pares de bases que codifican 37 genes: 2 de RNA ribosómicos, 22 de RNA de transferencia, y 13 de subunidades de los complejos de la mETC.



**Figura 1.11.** Mapa genético y transcripcional del mtDNA (Montoya, López-Pérez, & Ruiz-Pesini, 2006).

### 1.3.1.1 Dinámica mitocondrial

La funcionalidad de las mitocondrias se mantiene a través de procesos coordinados con factores nucleares que regulan la biogénesis y la eliminación de las mismas. En las mitocondrias son habituales las dinámicas de **fusión y fisión** de las mismas, mediadas esencialmente por enzimas mecanoquímicas de la familia de las GTPasas, que son capaces de remodelar las membranas (H. Lee & Yoon, 2016).

**Biogénesis.** Dado que no es posible generar mitocondrias *de novo* en las células, las nuevas se crean a partir de las ya existentes, a partir de procesos que implican la replicación, transcripción del mtDNA, traducción de genes, así como la síntesis, captación e internalización de proteínas nucleares y compartimentación de fosfolípidos. La replicación, transcripción y



traducción de proteínas nucleares están reguladas principalmente por NRF1 y 2, así como por PCG-1 $\alpha$  (Ploumi, Daskalaki, & Tavernarakis, 2017). Después de su síntesis, estas proteínas son internalizadas a través de translocasas de la OMM (Fraga & Ventura, 2015) y la IMM. La replicación del mtDNA y su regulación es un proceso cuyos mecanismos son complejos y debatidos por la comunidad científica (Montoya, 2010). Respecto a los procesos de transcripción y traducción mitocondriales, son propios del orgánulo y necesitan de la implicación de enzimas y factores de transcripción nucleares; además, el código genético utilizado es ligeramente distinto al universal (Montoya et al., 2006). Finalmente, tras la duplicación del material genético y el reclutamiento de las biomoléculas necesarias, ocurre el proceso de fisión en la mitocondria para concluir su biogénesis.

**Recambio y eliminación.** Los eventos de eliminación o de recambio en la mitocondria son también comunes y necesarios para mantener la homeostasis celular, en caso de daño en la función mitocondrial. El mecanismo más típico es el de autofagia, que puede involucrar un mecanismo específico para la mitocondria o no; de ser así, se denomina *mitofagia*. El mecanismo de autofagia implica la encapsulación de material citoplasmático en una membrana, al que se fusionarán lisosomas para hidrolizar el contenido. La mitofagia ocurre de la misma manera, pero tras el reconocimiento de receptores específicos que se expresan en la OMM tras daños en la mitocondria (Ploumi et al., 2017). Otra alternativa a la autofagia/mitofagia son los procesos de fusión y fisión, que permiten primero la dilución del componente dañado y después el aislamiento del mismo, respectivamente, siendo degradado sólo la vesícula formada y evitando así la eliminación del orgánulo completo (Sugiura, McLelland, Fon, & McBride, 2014).

### 1.3.1.2 Características genéticas de las mitocondrias

Adicionalmente a todas características que ya se han descrito, las mitocondrias poseen otras peculiaridades a nivel genético:

- **Elevada tasa de mutación.** El mtDNA no se asocia a proteínas, por lo que está más expuesto a la acción de ROS. Al no contener intrones ni secuencias no codificantes, cualquier cambio induce alteraciones en los genes mitocondriales. Además, los sistemas de reparación de daños y errores son menos eficientes que en el DNA nuclear. Por tanto, el genoma mitocondrial posee una mayor acumulación de errores respecto al del núcleo (Zinovkina, 2018). Estas mutaciones pueden inducir desórdenes y enfermedades. También se ha tratado de correlacionar la acumulación de mutaciones en el mtDNA con el envejecimiento (Michikawa, Mazzucchelli, Bresolin, Scarlato, & Attardi, 1999), si bien

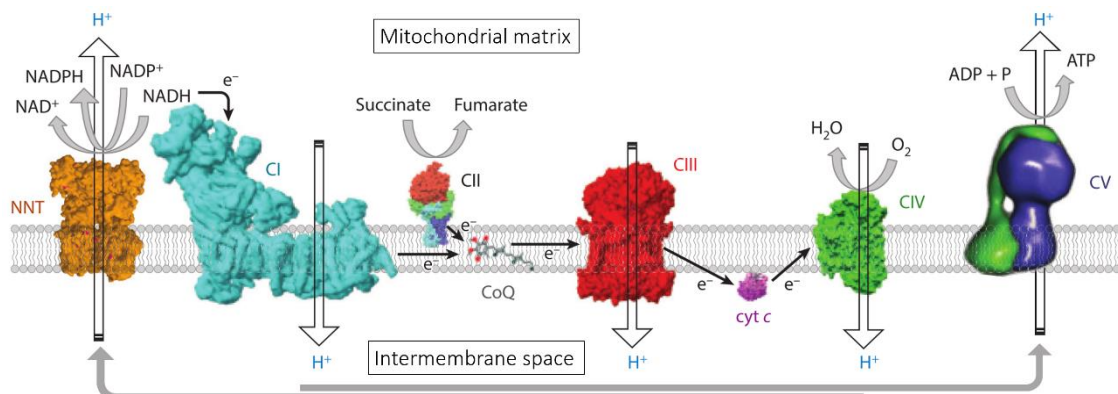
su rol en este campo sigue siendo a día de hoy contradictorio (Chocron, Munkacsy, & Pickering, 2019).

- **Poliploidía.** El número de copias de mtDNA en cada tipo celular es variable dependiendo de las necesidades energéticas celulares, teniendo la mayoría de ellos entre  $10^3$ - $10^4$  copias, con 2-10 moléculas de mtDNA por mitocondria (Montoya, 2010). Inicialmente, el mtDNA es idéntico en todas las células, condición conocida como *homoplasma*. No obstante, debido a la alta tasa de mutaciones, algunos de estas moléculas de mtDNA sufrirán mutaciones, mientras que otras no o de otro tipo, formándose así una condición de variedad genotípica del mtDNA que se denomina *heteroplasma*.
- **Umbral de enfermedad.** Una disfunción en la mitocondria por mutación en el mtDNA puede generar enfermedades. Aun así, mientras exista un porcentaje suficiente de heteroplasma de mtDNA sano, el organismo tendrá cubiertas sus necesidades energéticas. No obstante, al llegar a un determinado porcentaje, se comenzará a manifestar la enfermedad. Este umbral no es el mismo en todos los casos y depende de las necesidades energéticas del tejido en cuestión, de lo cual dependerá también la gravedad de los síntomas (Stewart & Chinnery, 2015).
- **Herencia materna.** Durante el proceso de meiosis de las espermatogonias, las mitocondrias son eliminadas, por lo cual la herencia de estos orgánulos es exclusivamente de la madre. Para compensarlo, los oocitos poseen cerca de  $10^5$  copias de mtDNA (Stewart & Chinnery, 2015).
- **Segregación mitótica al azar.** El material genético mitocondrial de una célula en heteroplasma se distribuye de forma aleatoria, por lo que la descendencia podrá estar en homoplasma (sana o mutada) o con un porcentaje variable de heteroplasma. Al derivar las células de un tejido de un solo grupo de células, las enfermedades mitocondriales suelen manifestarse como sistémicas.

### 1.3.1.3 Componentes de la mETC

La mayor parte de la energía que se genera en las células en forma de ATP a partir de la degradación oxidativa de los nutrientes, se genera en la mitocondria, mediante el uso de la mETC. En ella, existen varias proteínas que se insertan en la IMM, llamados *complejos respiratorios*, que van transportando los electrones que donan el NADH y el  $\text{FADH}_2$ , provenientes en su mayoría de procesos catabólicos, de forma consecutiva hasta el último aceptor, el  $\text{O}_2$ , que se transforma en agua (Figura 1.12). Durante el proceso, los complejos I, III y IV respiratorios bombean  $\text{H}^+$  desde la

matriz mitocondrial al espacio intermembrana, creando entre ambos compartimentos un gradiente de pH que aprovecha el último de estos complejos, la ATP sintasa o complejo V (C.V),



para catalizar la conversión de ADP + grupo fosfato en ATP al romperlo (Enríquez, 2016).

**Figura 1.12.** El sistema OXPHOS. Modificado de (Enríquez, 2016).

Existen un total de 5 complejos respiratorios (Enríquez, 2016):

- El **complejo I**, también llamado complejo de la NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidoreductasa (C.I) tiene como función aceptar los electrones del NADH y transferirlos a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ), reduciéndola y formando  $CoQH_2$ , a la vez que bombea 4  $H^+$  por molécula de NADH hacia el espacio intermembrana. El C.I está formado por 44 subunidades, 7 de ellas codificadas por el mtDNA (ND1 a ND6, incluyendo ND4L) y el resto por el DNA nuclear.
- El **complejo II** o succinato deshidrogenasa (C.II) recibe electrones de forma alternativa desde el  $FADH_2$ , mediante la catálisis de la conversión de succinato a fumarato. Estos electrones los recibe también la CoQ, reduciéndose a  $CoQH_2$ . Como particularidades, todas las subunidades del C.II son codificadas por el núcleo, y no bombea  $H^+$  al espacio intermembrana.
- El **complejo III** o ubiquinol:citocromo c reductasa (C.III) cataliza la reacción general en la que la  $CoQH_2$  dona sus electrones al citocromo c, bombeando 4  $H^+$  por molécula de NADH. Esto se realiza mediante una cadena de reacciones de óxido-reducción en las que participan otras subunidades de citocromos del C.III. Este complejo posee 11 subunidades, de las cuales sólo el citocromo b se codifica en la mitocondria.
- El **complejo IV** o citocromo c oxidasa (C.IV, o COX) recibe finalmente los electrones del citocromo c y los transfiere al  $O_2$ , reduciéndose a agua y bombeando en el proceso 2  $H^+$  por molécula de NADH. El C.IV es el último aceptor de electrones y posee 14 subunidades, de las cuales 3 se codifican en el mtDNA (MT-CO1-3).

- El **complejo V** o ATP sintasa (C.V), como ya se ha comentado, se encarga de catalizar la conversión de ADP + grupo fosfato en ATP aprovechando la energía almacenada en el gradiente electroquímico de protones generado durante el transporte de electrones. La región  $F_o$  de la ATP sintasa actúa como un poro de protones que los transporta desde el espacio intermembrana a la matriz y dirige la energía liberada en la disipación del gradiente electroquímico a la parte  $F_1$  que es donde se forma el ATP. La energía se transfiere de una parte a otra mediante un mecanismo de motor rotatorio (Stock, Leslie, & Walker, 1999). El C.V está formado por 11 subunidades, 2 de las cuales son codificadas por la mitocondria (MT-ATP6 y MT-ATP8).

#### 1.3.1.4 Organización de la mETC

La forma en la que se organizan los complejos respiratorios en la mETC ha sido objeto de debate en la comunidad científica durante décadas, habiéndose propuesto 3 modelos distintos.

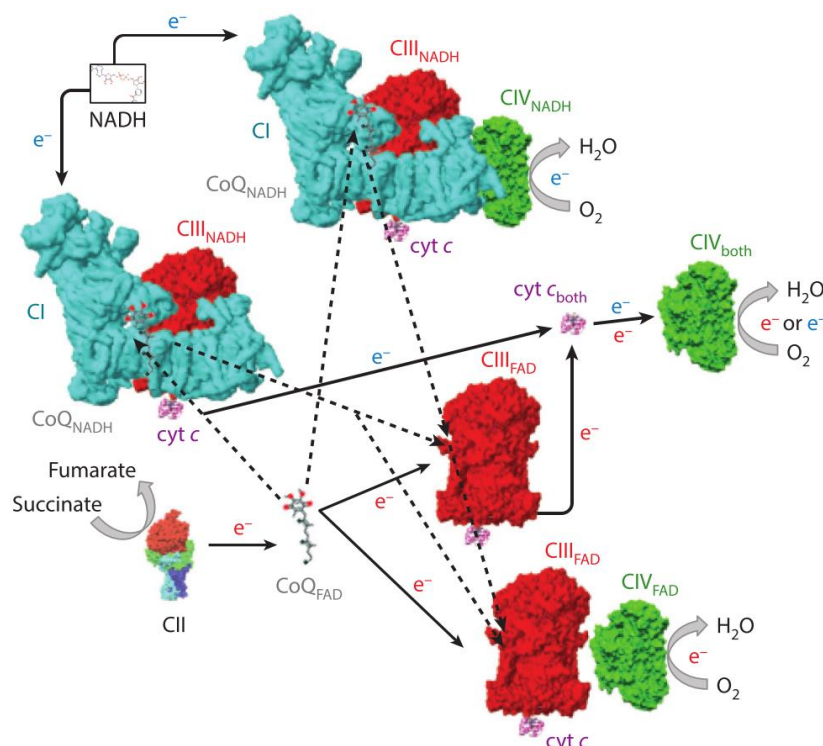
**Modelo sólido.** Este fue el primer modelo propuesto. Según esta teoría, los complejos respiratorios se encuentran organizados de forma conjunta, formando una estructura rígida supramolecular denominada *oxisoma* (Chance, Estabrook, & Lee, 1963). Esta organización les permitiría a las mitocondrias una mayor accesibilidad a los componentes de la mETC y, por tanto, una mayor actividad catalítica (Keilin & Hartree, 1947).

**Modelo fluido.** El aislamiento de los complejos respiratorios por separado y la demostración de que eran funcionales por sí mismos hizo que se comenzara a cuestionar el modelo sólido (Hatefi, Haavik, Fowler, & Griffiths, 1962). Varios años más tarde se publicó la descripción de este nuevo modelo, llamado modelo fluido. El *modelo fluido* propone que todas las proteínas y componentes de la mETC se encuentran en la IMM en constante movimiento y difusión de forma independiente, conectando el flujo de electrones a través de las moléculas transportadoras (CoQ y citocromo c), convirtiéndose así en un sistema de difusión de múltiples colisiones y de largo alcance (Hackenbrock, Chazotte, & Gupte, 1986). El modelo fluido tuvo buena aceptación en la comunidad científica y se convirtió en el modelo aceptado durante décadas.

**Modelo de plasticidad.** No fue hasta el año 2000 cuando se comenzó a cuestionar el modelo fluido. Shägger y Pfeiffer, mediante el análisis de preparaciones mitocondriales por electroforesis en gel de proteínas nativas no desnaturalizadas, observaron la presencia de múltiples bandas de complejos respiratorios que migraban asociados (Schägger & Pfeiffer, 2000). A diferencia del modelo sólido, sí había aparición de complejos en forma libre, así como la

ausencia del C.V en las bandas de los múltiples complejos. Estas asociaciones de los complejos entre sí se conocen como supercomplejos respiratorios (SC's).

De acuerdo con este *modelo de plasticidad*, los complejos respiratorios no se encuentran solamente de forma libre o totalmente asociados entre sí, sino que ambas formaciones pueden coexistir, estableciéndose de esta forma interacciones dinámicas entre ellos (Acín-Pérez, Fernández-Silva, Peleato, Pérez-Martos, & Enríquez, 2008) (*Figura 1.13*). Además, en función del tipo celular y de los estímulos fisiológicos que éste reciba, la cantidad relativa de complejos en forma libre o asociados como SC's se puede modular, creando un panorama de numerosas variables (Lobo-Jarne & Ugalde, 2018). Después de varios años de intenso debate, parece que este último modelo es el que finalmente va ganando mayor aceptación. Los SC's que suelen detectarse en los diversos análisis son: C.I-C.III-C.IV, también llamado *respirasoma*, y C.III-C.IV. Se ha observado además la participación del factor de ensamblaje de SC's 1 (SCAF1) en la formación de dichos SC's (Lapiente-Brun et al., 2013), o la modulación de la formación de los mismos en la mitocondria para aumentar la eficiencia del sistema OXPHOS en caso de cambios en la fuente de carbono disponible (Lapiente-Brun et al., 2013).



**Figura 1.13.** Asociaciones y flujo de electrones en el modelo de plasticidad (Enríquez, 2016).

### 1.3.2 Mitocondria en enfermedades

Las mitocondrias, como se ha explicado durante este apartado, poseen características únicas dentro de la célula y juegan un papel crucial para la homeostasis de la misma. Por tanto,

la pérdida de función de este orgánulo puede generar desórdenes de gravedad variable en el organismo.

### **1.3.2.1 Enfermedades mitocondriales**

El término de *enfermedad mitocondrial* engloba un grupo heterogéneo de desórdenes patológicos originados por una o varias alteraciones en el sistema OXPHOS pudiendo deberse a mutaciones en el mtDNA o en el DNA nuclear. Estas patologías suelen ser **multisistémicas**, si bien aquellos tejidos de mayor demanda de energía son los que habitualmente se encuentran más afectados.

Se han descrito hasta la fecha más de 250 **alteraciones en el mtDNA** que pueden generar patología (Craven, Alston, Taylor, & Turnbull, 2017). Estas alteraciones se pueden discernir entre mutaciones puntuales, deleciones o por disminución del número de copias del mtDNA (deplecciones). Otras **características** de las enfermedades mitocondriales son que distintas mutaciones en el mtDNA puedan dar lugar al mismo fenotipo patológico, que una misma mutación pueda dar fenotipos muy distintos, que afecte a un solo tejido o incluso que los síntomas de unas u otras enfermedades se solapen. El grado de heteroplasmia y el umbral de enfermedad son también otros factores que determinan el grado de manifestación de la enfermedad. Finalmente, otro aspecto que influye es el genotipo mitocondrial o *haplogrupo*. La alta tasa de mutación en el mtDNA genera en la población variantes polimórficas o *haplotipos* que pueden no ser dañinas. Sin embargo, se ha observado que algunos haplogrupos pueden constituir factores de susceptibilidad para la manifestación de enfermedades mitocondriales (Wei, Gómez-Durán, Hudson, & Chinnery, 2017). Globalmente, todas estas particularidades dotan a estas enfermedades mitocondriales de una gran complejidad.

Algunas de las enfermedades mitocondriales más frecuentes son: la encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebro-vasculares (MELAS), la neuropatía óptica hereditaria de Leber, el síndrome de Leigh de herencia materna, la epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas o el síndrome de Pearson (Montoya, 2010). Dado que las causas de estas enfermedades son por daño en el genoma mitocondrial, no existe actualmente una cura que pueda corregir dichos fallos, de modo que la mayoría de **tratamientos** para estas enfermedades son sintomáticos. Éstos se basan en fármacos, cirugía, transfusiones de sangre, medidas dietéticas y fisioterapia, si bien cada tratamiento es personalizado, en función de la mutación presente y la sintomatología del paciente (Davison & Rahman, 2017).

### 1.3.2.2 Mitocondria y cáncer

Debido a la íntima relación entre el *efecto Warburg*, el metabolismo energético de los tumores y la función mitocondrial, muchas características que se han comentado sobre el metabolismo tumoral en el *Apartado 1.2* convergen también en esta sección.

**Etapas iniciales.** Se han encontrado una gran variedad de **defectos en el mtDNA** en células cancerosas, especialmente aquellas producidas por mutaciones somáticas puntuales y en la variación del número de copias del mtDNA (Hsu, Tseng, & Lee, 2016) (Gallardo et al., 2006). Dado que estas alteraciones favorecen la **disfunción de la vía OXPHOS**, su aparición correlaciona con el *fenotipo Warburg* generalmente observado en los tumores en sus primeros estadios de crecimiento. Aun así, esta correlación no implica causalidad; hay varios eventos posibles que conducen a los tumores a presentar este comportamiento, además de que no todos los tumores recién formados poseen defectos en la mitocondria (Koppenol et al., 2011). En relación con esto, se ha demostrado que las células que carecen totalmente de mtDNA, conocidas como células  $p_0$ , no son tumorigénicas (Weinberg et al., 2010) (Cruz-Bermúdez et al., 2015), es decir, parece que es necesario que las células tumorales posean mitocondrias con, al menos, cierto grado de funcionalidad (A. S. Tan et al., 2015) (Valcárcel-Jiménez, Gaude, Torrano, Frezza, & Carracedo, 2017), si bien la inhibición parcial de su maquinaria OXPHOS favorece claramente en su conjunto su crecimiento en las primeras fases (ver *Apartado 1.2.2.1*).

Además del metabolismo energético, **otras rutas** en las que la mitocondria participa para apoyar la supervivencia tras la carcinogénesis son las vías anabólicas de síntesis de biomoléculas e, indirectamente, el balance redox y la producción de lactato (ver *Apartado 1.2.2.2*).

**Progresión tumoral y metástasis.** Las mitocondrias parecen jugar un papel muy activo en ambos procesos de progresión tumoral y metástasis. Uno de ellos es la **resistencia a la apoptosis**. La vía intrínseca de la apoptosis se desencadena por la salida del citocromo c de la mitocondria, y en ella múltiples proteínas de la familia de Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) están implicadas en conservar el balance entre la inducción o no de su salida (pro o anti-apoptóticas, respectivamente). Si bien no son codificadas por el genoma mitocondrial, las proteínas anti-apoptóticas se localizan en la OMM para impedir la salida del citocromo c, y se encuentran usualmente sobreexpresadas en los tumores. Otra característica de la activación de la vía apoptótica intrínseca es la caída del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Se ha demostrado que células tumorales con fenotipo más agresivo poseen un  $\Delta\Psi_m$  mayor que aquellas que responden mejor a fármacos anti-tumorales (Heerdt, Houston, & Augenlicht, 2005).

Además de esto, al igual que en las primeras etapas de progresión, las mitocondrias participan activamente en la **readaptación** de las células cancerosas para la síntesis de biomoléculas, así como indirectamente de la homeostasis redox (a partir de la formación de los mismos en la mETC) y la formación de lactato (ver *Apartado 1.2.2.3*).

Finalmente, otro aspecto importante del papel de las mitocondrias en la progresión tumoral y la metástasis es su **funcionalidad OXPHOS**. Como ya se ha debatido previamente en el *Apartado 1.2.2.3*, en células con fenotipo invasivo se han encontrado tanto mitocondrias funcionales como no funcionales. Esto implica que los defectos en la cadena respiratoria no parecen ser obligatoriamente necesarios para que una célula tumoral metastatice. No obstante, cada vez van acumulándose más pruebas en la literatura de las ventajas que les proporciona a los tumores poseer defectos en la vía OXPHOS o en el mtDNA, empujándoles hacia un *fenotipo Warburg*, para progresar en la enfermedad (ver *Tabla 1.1*). De hecho, estos defectos en la mitocondria pueden afectar al desarrollo tumoral a través de lo que se conoce como *señalización retrógrada al núcleo*. Bajo situaciones como mutaciones en el mtDNA, defectos en la mETC o aumento del  $\Delta\Psi_m$ , estas mitocondrias defectuosas son capaces de comunicarse con el núcleo de la célula tumoral para inducir cambios en múltiples vías de señalización, con el objetivo de readaptarse a una nueva configuración de su metabolismo (Guha & Avadhani, 2013). De esta manera, se ha observado que la alteración del mtDNA en tumores, altera epigenéticamente la expresión de genes en el núcleo mediante la metilación del DNA nuclear, posiblemente contribuyendo a la patogenicidad de la metástasis (Vivian et al., 2017).



Tabla 1.1. Correlaciones encontradas entre defectos en el mtDNA o la mETC y mayor progresión tumoral y/o potencial metastásico.

Causa	Efecto	Tipo de cáncer	Tipo de estudio	Referencia
Elim. de NDUFS3 y NDUFA13	+ Migración	Mama	<i>In vitro</i>	(X. He et al., 2013)
Elim. de NDUFV1	+ Potencial metastásico	Mama	<i>In vivo</i>	(Santidrian et al., 2013)
Elim. parcial del mtDNA con BrEt	+ Prop. invasivas	Carcinoma de pulmón	<i>In vitro</i>	(Amuthan et al., 2002)
Elim. parcial del mtDNA con BrEt	+ Prop. invasivas	Cérvix	<i>In vitro</i>	(P. E. Porporato et al., 2014)
Elim. parcial del mtDNA con BrEt y cloranfenicol	+ Prop. invasivas	Hígado	<i>In vitro</i>	(Chang et al., 2009)
Inhib. de mETC con oligomicina A y antimicina A	+ Prop. invasivas	Carcinoma de pulmón	<i>In vitro</i>	(S. Y. Han et al., 2018)
Inhib. de NDUFA9	+ Prop. invasivas	Hígado	<i>In vitro</i>	(J. H. Lee et al., 2015)
Inhib. del C.I con rotenona	+ Prop. invasivas	Mama	<i>In vitro</i>	(Ma et al., 2013)
Mut. de mtDNA sobre OXPHOS no identificado	+ Progresión tumoral	Osteosarcoma y mama	<i>In vitro e in vivo</i>	(Kaipparattu et al., 2013)
Mut. en bucle-D: A16117T y A16368T	+ Prevalencia en pacientes con metástasis	NSCLC	Epidemiológico	(Matsuyama et al., 2003)
Mut. en C.IV (no identificadas)	+ Prop. invasivas	Esofágico y mama	<i>In vitro e in vivo</i>	(Srinivasan et al., 2015)
Mut. en ND2: G4776A	+ Progresión tumoral	Carcinoma de cabeza y cuello	<i>In vitro</i>	(W. Sun et al., 2009)
Mut. en ND3: A10398G	+ Prevalencia en pacientes con metástasis	Metástasis ósea de cáncer de próstata	Epidemiológico	(Arnold et al., 2015)
Mut. en ND4 (C12084T) y ND5 (A13966G)	+ Potencial metastásico	Mama	<i>In vivo</i>	(Imanishi et al., 2011)
Mut. en ND5 : G13289A	+ Prop. invasivas	Carcinoma de pulmón	<i>In vitro</i>	(Dasgupta et al., 2012)
Mut. en ND6 (variadas)	+ Prop. invasivas	Carcinoma de pulmón	<i>In vitro</i>	(Yuan et al., 2015)
Mut. en ND6: G13997A y 13885insC	+ Potencial metastásico	Carcinoma de pulmón de Lewis	<i>In vivo</i>	(Ishikawa et al., 2008)
Mut. en ND6: 13885insC	+ Potencial metastásico	NSCLC y colon	<i>In vivo</i>	(Koshikawa, Akimoto, Hayashi, & Nagase, 2017)
Mut. en NDUFB9	+ Prop. invasivas	Mama	<i>In vitro</i>	(L. D. Li et al., 2015)
Mut. en tRNA : A12308G	+ Potencial metastásico	Mama	<i>In vitro e in vivo</i>	(Kulawiec, Owens, & Singh, 2009)
Mut. en tRNA : A3243T	+ Potencial metastásico	Osteosarcoma	<i>In vitro e in vivo</i>	(Nunes et al., 2015)

## 1.4 SISTEMA INMUNITARIO Y CÁNCER

Hasta ahora se ha explicado cómo las células cancerosas remodelan su metabolismo para conseguir plantar cara a las adversidades que se enfrentan en el organismo, en sus estadios de progresión tumoral. Sin embargo, ¿cómo el organismo le planta cara al tumor?

### 1.4.1 Conceptos generales del sistema inmunitario

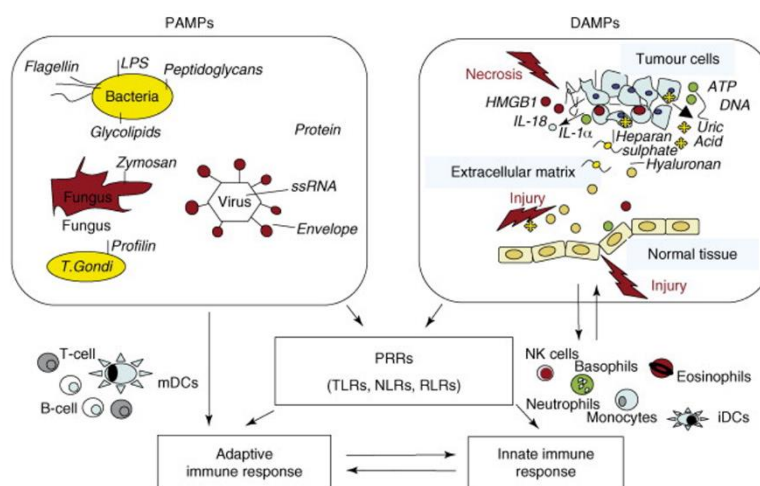
El *Sistema Inmunitario (SI)* está formado por todas aquellas células del organismo que lo defienden de lo que ellas interpretan como agentes patógenos o dañinos. En función del tipo de respuesta inmunitaria que se monta, se puede clasificarse en dos tipos:

- ***Inmunidad innata.*** Es aquella que está de forma natural en prácticamente todos los organismos. Es un tipo de respuesta rápida, inespecífica a los agentes patógenos que lo invaden e idéntica si se repite el mismo tipo de infección. Los componentes mayoritarios de la inmunidad innata son los granulocitos (donde se incluyen los basófilos, eosinófilos, mastocitos y neutrófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC's) y las células asesinas naturales (células NK). Las barreras físicas del propio organismo, como la piel o las mucosas, también pueden considerarse como parte de esta clase de inmunidad (Riera Romo, Perez-Martinez, & Castillo Ferrer, 2016).
- ***Inmunidad adaptativa.*** Por el contrario, la inmunidad adaptativa es una respuesta que se monta de forma específica al tipo de infección que se produce. Para que se lleve a cabo, las células del SI adaptativo poseen receptores de membrana específicos para reconocer al *antígeno*. Tras el reconocimiento, atacarán de forma específica a dicho agente patógeno, respuesta que lleva varios días para que se lleve a cabo. Adicionalmente, esta interacción con el antígeno genera lo que se conoce como *memoria inmunitaria*; es decir, si se repite el mismo tipo de infección, estas células responderán de forma más rápida e intensa en comparación con la reacción primaria. Las células del SI que lo componen son los linfocitos T y los linfocitos B. Cada uno de ellos genera un tipo de respuesta distinta, llamadas *respuesta celular* y *respuesta humoral*, respectivamente.

Todas las células del SI derivan de una célula precursora llamada ***célula madre hematopoyética***. Estas células pluripotentes residen en la médula ósea y tienen además la capacidad de regenerarse. Allí, pueden comenzar a diferenciarse en dos precursores principales: el progenitor mieloide, que a su vez podrá derivar a granulocito, macrófago, monocito, eritrocito o plaqueta, y el progenitor linfoide, que podrá derivar a DC, linfocito B, T o célula NK. A excepción de los linfocitos T, que terminan su maduración en el timo, el resto de progenitores inmaduros

se desarrollan en la médula ósea. Por ello, ambos tejidos se conocen como órganos linfoides primarios. Tras su diferenciación, las células del SI se localizan en los órganos linfoides secundarios: el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas. Para transitar por los tejidos, hacen uso de los vasos sanguíneos y de los vasos linfáticos, donde circulan la sangre y la linfa, respectivamente.

La forma en la que se monta la **respuesta inmunitaria** puede ser muy compleja y varía en función del patógeno al que se enfrenta el organismo (*Figura 1.14*). Dicho esto, y de forma general, al comienzo de la respuesta inmunitaria, son las células del SI innato las que reconocen, a través de los receptores de reconocimiento de patrones, unos patrones moleculares que pueden estar asociados tanto a agentes patógenos externos (patrones moleculares asociados a patógenos, o *PAMP*) como a propios (patrones moleculares asociados a peligro, o *DAMP*) (Matzinger, 1994). Tras acudir al sitio de donde viene la señal de peligro, montarán una primera línea de defensa contra el agente patógeno. De las células que acuden, los macrófagos y DC's son capaces de fagocitar, endocitar y procesar al agente patógeno, exponiendo una fracción de él (*antígeno*) en su superficie, a través de una proteína de membrana llamada complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Estas células son conocidas como *células presentadoras de antígeno* (*APC's*), donde también se incluyen a los linfocitos B. Una vez expuesto, en asociación con el MHC, el antígeno puede ser reconocido por los linfocitos T y así, se pone en marcha una respuesta inmune contra ese agente patógeno.



**Figura 1.14.** Reconocimiento de señales patológicas por parte del SI. Modificado de (Rubartelli & Lotze, 2007).

Aun así, la mera presencia y reconocimiento del antígeno no es suficiente para la completa activación de los linfocitos T y B inmaduros o *naïve*. También son necesarias una serie de interacciones entre unas células y otras para la activación completa de estos linfocitos

(Cantrell, 2015), entre las que destaca la interacción de la molécula de co-estimulación CD28 con sus receptores en la APC CD80 o CD86.

Caso aparte son las **células NK**. Estas células, pertenecientes al SI innato, son capaces de reconocer e inducir muerte en células tumorales o en aquellas que están infectadas sin estimulación previa. Las células NK poseen unos receptores (KIR's; *Killer Immunoglobulin-like Receptors*) que interaccionan con el MHC-I de las células e inhiben su acción, consiguiendo de esta manera discernir entre células normales y dañadas. Poseen también varios ligandos que pueden favorecer o disminuir su acción citotóxica, existiendo así un balance que hará que las células NK se decanten por atacar o no, en función de si la inducción de las señales de activación es más potente que la de inhibición. Las células NK se caracterizan mediante marcadores específicos, como el receptor de la fracción Fc de los anticuerpos CD16 y CD56 (Farag & Caligiuri, 2006).

#### 1.4.2 Activación de las células del SI adaptativo

Los linfocitos T reconocen el MHC a través de su receptor de células T (TCR), que siempre se expresa asociado con las moléculas del CD3. Los diferentes tipos de linfocitos T son los siguientes (Koch & Radtke, 2011):

- **Linfocitos T auxiliares ( $T_h$ ).** También llamados linfocitos T  $CD4^+$ , dado que expresan este antígeno en superficie. Reconocen específicamente al MHC-II que solamente expresan las APC's profesionales. Tras el reconocimiento antigénico, y en presencia de co-estimulación a través de CD28, los linfocitos T  $CD4^+$  comenzarán a proliferar, secretando interleucinas y factores que reforzarán la respuesta inmune. Dentro de las células  $T_h$  efectoras, existen las subclases:  $T_{h1}$ , que reconocen principalmente a macrófagos y colaboran en la inmunidad celular;  $T_{Fh}$  ( $T_h$  foliculares), que colaboran en la activación de los linfocitos B y en la inmunidad humoral;  $T_{h2}$ , que fomentan la producción de IgE y colaboran en la inmunidad contra parásitos;  $T_{h17}$ , que participan en la defensa contra bacterias y hongos; y los T reguladores ( $T_{reg}$ ), que participan en la supresión de la actividad inmunitaria como mecanismo de regulación para auto-limitar la acción del SI.
- **Linfocitos T citotóxicos (CTL's).** Se pueden denominar también linfocitos T  $CD8^+$ , dado que presentan específicamente este antígeno. Los linfocitos T  $CD8^+$  *naïve* reconocen en este caso al MHC-I, que es expresado, a diferencia del MHC-II, por todas las células nucleadas. A través de esta señal, así como la transducción de otras señales coestimuladoras (entre ellas, los factores secretados por los linfocitos  $T_h$ ), madurarán para convertirse

propiamente en CTL's. Su función es la de reconocer y atacar las células infectadas para inducir su muerte. Esto constituye la *inmunidad celular*.

- **Linfocitos NKT.** Son linfocitos T que poseen también de célula NK: poseen TCR, algunas expresan CD4, tienen receptores para anticuerpos, y presentan la capacidad tanto de atacar células infectadas como de liberar citoquinas para modular la respuesta inmune. También se caracterizan por reconocer lípidos y glucolípidos presentados a través de CD1, en lugar de péptidos asociados al MHC.
- **Linfocitos T  $\gamma\delta$ .** Por último, existen otros linfocitos T que poseen un TCR distinto a los anteriores, que expresan un TCR- $\alpha\beta$ . Los linfocitos T  $\gamma\delta$  expresan un TCR- $\gamma\delta$  y reconocen fosfoantígenos en lugar del MHC. Éstos también poseen características de otros tipos celulares, como receptores de activación de las células NK y capacidad de presentación antigénica. Participan tanto en la secreción de citoquinas estimuladoras como atacando a las células infectadas o tumorales.

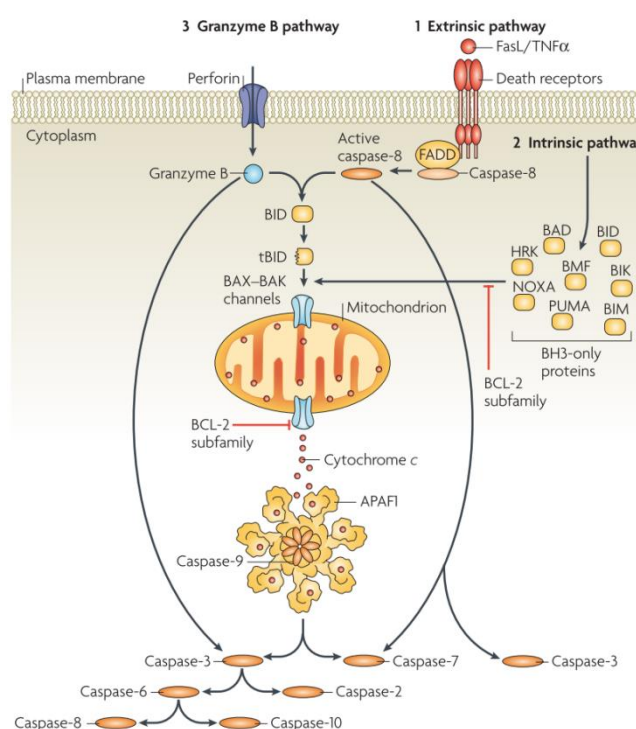
### 1.4.3 Mecanismos citotoxicidad de los CTL y las células NK

Primeramente, los CTL y las células NK, tras reconocer al antígeno a través de su TCR o recibir suficientes señales de activación (respectivamente), se adhieren a la célula diana a través, principalmente, del receptor LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*), que interacciona con la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (Barber, Faure, & Long, 2004), formando una estructura supramolecular que favorece la *sinapsis inmunológica*.

Existen varias formas por las cuales los CTL y las células NK atacan a la célula dañada para inducir su muerte. Aunque los estímulos que provocan su acción son distintos, los mecanismos que utilizan son similares:

- **Ligandos mortales.** Los ligandos mortales son miembros de la superfamilia del TNF que inducen muerte a través de la unión a sus receptores de las células diana. De entre ellos, los que más expresan los CTL y las células NK son el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y el ligando de Fas, cuyos receptores para transducir la muerte son TNF-R1, receptor mortal 4 y 5 (DR4 y DR5) y Fas, respectivamente. Estos ligandos se expresan en la superficie de las células efectoras una vez que éstas han sido activadas (Anel, Buferne, Boyer, Schmitt-Verhulst, & Golstein, 1994) o pueden ser secretados en asociación con exosomas (Martínez-Lorenzo et al., 1999). Tras la unión con su receptor mortal, se induce en el interior de la célula diana una cascada de eventos que finaliza con el corte y la activación de unas serín proteasas

conocidas como caspasas que, al igual que las granzimas, cortarán sustratos que participan en el mantenimiento de la supervivencia y muerte celular, induciendo su *apoptosis* (Figura 1.15) (Nagata, 1997). Esta ruta apoptótica se conoce como *vía extrínseca* de la apoptosis (Martínez-Lostao, Anel, & Pardo, 2015). Adicionalmente, varias de estas caspasas activas pueden procesar a otra proteína llamada Bid, perteneciente al grupo de proteínas *sólo BH3* (que se incluyen dentro de la familia de proteínas de Bcl-2), dando lugar a un fragmento corto denominado tBid. Este tBid puede, a su vez, favorecer la activación de la *vía intrínseca* mitocondrial de la apoptosis, amplificando de esta manera la señal de muerte (Taylor, Cullen, & Martin, 2008) (ver Figura 1.15).



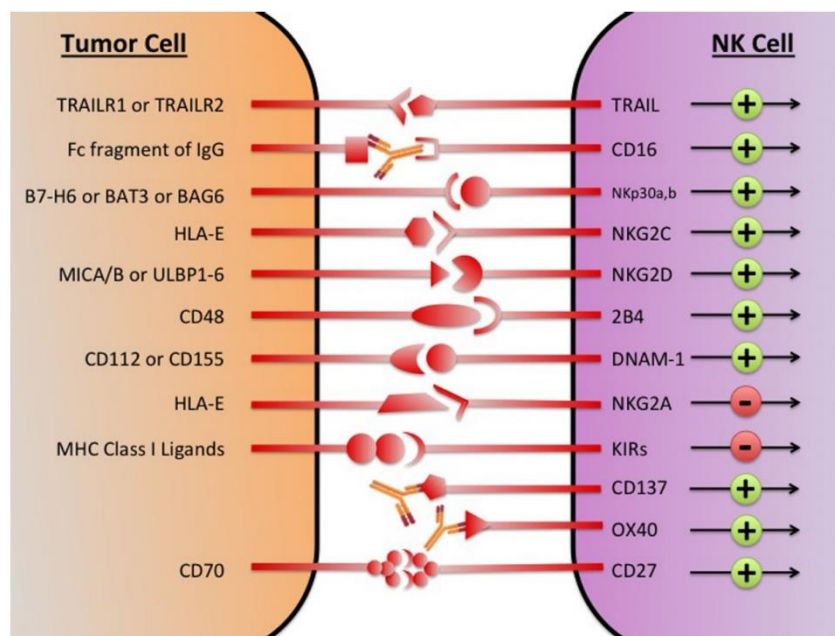
**Figura 1.15.** Esquema de los mecanismos de inducción de apoptosis (Taylor et al., 2008).

- **Exocitosis granular.** Ambos tipos celulares poseen gránulos citoplasmáticos que contienen dos tipos de proteínas: perforinas (formadoras de poro) y granzimas (familia de serín proteasas). Tras los estímulos de activación, la célula efectora aproxima los gránulos por medio del centro organizador de microtúbulos y libera su contenido en la sinapsis inmunológica. Allí, la perforina forma un poro en la membrana de la célula diana, a través de la cual entran las granzimas (Stinchcombe, Bossi, Booth, & Griffiths, 2001). Esta citotoxicidad la ejerce procesando proteolíticamente sustratos intracelulares clave en el control de la muerte y la homeostasis celular (Voskoboinik, Whisstock, & Trapani, 2015). Entre ellos, destaca su capacidad para procesar a la caspasa-3, iniciando la cascada de activación de caspasas y la muerte celular apoptótica (Darmon, Nicholson, &

Bleackley, 1995) (Pardo et al., 2004). Dentro de las granzimas, se ha demostrado que es la granzima B la que realmente ejerce citotoxicidad (Pardo et al., 2009).

En el caso concreto de las **células NK**, como se ha comentado anteriormente, éstas actuarán o no, en función del **balance entre las señales de activación o inhibición** mediadas por la interacción entre sus receptores con los ligandos de las células diana (*Figura 1.16*). Respecto a las *señales de activación*, las interacciones serían: NKG2D con MICA/B (*MHC class I polypeptide-related sequence A/B*) o con ULBP-1 (*UL16 Binding Protein 1*); DNAM con CD112 y CD155; los receptores de citotoxicidad natural (NCR's) como NKp30, NKp44 o NKp46 con sus ligandos celulares, todavía no totalmente caracterizado, o con ligandos virales o bacterianos (Long, Kim, Liu, Peterson, & Rajagopalan, 2013). En cuanto a las *señales de inhibición*, además de la mediada por la unión de los receptores KIR con el MHC-I, también influye negativamente la unión del receptor NKG2A con el antígeno leucocitario humano-E (HLA-E) (Chester, Fritsch, & Kohrt, 2015).

Adicionalmente, las células NK, gracias a CD16, pueden mediar la **citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)**. A través del receptor CD16, la célula NK puede unirse a la región Fc de una IgG que, a su vez, esté dirigida para reconocer un antígeno en la superficie de la célula diana, favoreciendo así la interacción entre ambas células y facilitando la acción citotóxica de la célula efectora (Muntasell et al., 2017).



**Figura 1.16.** Señales de activación e inhibición de las células NK contra el tumor (Chester et al., 2015).

#### 1.4.4 El Sistema Inmunitario en el Cáncer

De la misma manera que el SI reconoce y actúa contra agentes patógenos externos o células dañadas del organismo, también se encarga de tratar de eliminar a los tumores formados.

##### 1.4.4.1 *El ciclo de inmunidad anti-tumoral*

Una vez que ha ocurrido el proceso de oncogénesis, para que las células tumorales sean reconocidas por el SI, deben generar algún tipo de daño en el tejido donde crecen, para que se generen DAMP's a modo de señales pro-inflamatorias. En caso contrario, comenzará a crecer de forma silenciosa y el SI no lo reconocerá. Los tumores que no son reconocidos de esta manera por el SI se conocen como tumores no inmunogénicos. Se cree que la acción del SI en este estadio se realiza de forma cíclica hasta que se produce la eliminación del tumor, proceso conocido como *ciclo de inmunidad anti-tumoral* (Chen & Mellman, 2013).

Las primeras células inmunitarias en acudir al tumor son varias del SI innato, como las células NK y las células NKT, y también los linfocitos T  $\gamma\delta$ . Estas células se encargarán de producir citoquinas pro-inflamatorias como el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y de atacar al tumor (de forma poco eficiente) creando, como resultado, *cuerpos apoptóticos* tumorales. En este momento, las DC's inmaduras y macrófagos residentes en el tejido se encargarán de fagocitar estos cuerpos apoptóticos, de procesarlos y de generar antígenos tumorales, que serán presentados en la superficie a través del MHC-I y II (Woo, Corrales, & Gajewski, 2015). Adicionalmente, la secreción de factores como interleucinas (como la IL-12 o IL-15) por parte de las APC's activadas, y de quimioquinas por acción de las células del tejido circundante hace aumentar la actividad y la migración (respectivamente) de células inmunitarias. Las APC's activadas migran posteriormente al ganglio linfático más cercano y allí presentan los antígenos tumorales a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (tipo T<sub>h</sub>1) y T CD8<sup>+</sup>. Éste producirá su activación y expansión clonal y, finalmente, su migración al tejido dañado. Allí, reconocerán los antígenos tumorales y atacarán a las células tumorales, tratando de inducir muerte en ellos. Esto conllevará la formación de cuerpos apoptóticos del tumor, volviendo de nuevo a comenzar el ciclo de reconocimiento de los antígenos tumorales formados por las APC's, amplificándose de esta manera la respuesta y produciéndose de forma cíclica hasta la eliminación del tumor, o bien la evasión del mismo al ataque del SI (Antón, Anel, Martínez-Lostao, Pardo, & Pazo, 2018).



#### 1.4.4.2 El modelo de inmunoección del cáncer

Todos los eventos descritos en la sección anterior constituyen la eliminación del tumor. No obstante, es evidente que este proceso no siempre acaba con la victoria del SI, sino que el tumor puede llegar a soportar el ataque continuo del organismo y, eventualmente, avanzar en su progresión tumoral. La teoría que explica estos mecanismos es conocida como el *modelo de inmunoección del cáncer*, propuesta por el grupo de Robert Schreiber en 2002 (Dunn et al., 2002). En este modelo, la acción del SI sobre el cáncer se resume en tres posibles etapas, también denominadas *las tres "E's"*, que son: *Eliminación*, *Equilibrio* y *Escape*. El fracaso de cada una de las partes implica el paso a la siguiente fase (*Figura 1.17*).

Cuando el SI no consigue eliminar al tumor, se llega a la segunda fase. Durante esta etapa de *Equilibrio*, la generación de células inmunes de memoria permite el mantenimiento continuo del ataque al tumor. Esta acción del SI, suficiente para mantener controladas las células tumorales, pero no tanto como para erradicarlo, constituye un balance en el organismo que puede alargarse incluso durante años (Koebel et al., 2007).

Sin embargo, cuando llegamos a detectar el tumor, éste ha sido capaz de superar tanto la fase de eliminación como la de equilibrio. Esto puede estar motivado por varias razones:

- Como se ha comentado en apartados anteriores, las células tumorales poseen una **alta tasa de mutación**. Esto implica la generación eventual de células cancerosas con mayor capacidad de resistencia al ataque del SI y, por tanto, la posibilidad de avance del tumor a partir de clones resistentes.
- El continuo ataque del SI puede generar en los tumores un **proceso de selección** darwiniana, donde aquellos clones que sepan adaptarse mejor a esta situación serán los que acaben creciendo en el tejido neoplásico.
- Por último, el propio **TME** generado por los tumores es **inmunosupresivo**, modulando de esta manera la respuesta inmune hacia el cese del ataque del SI (ver *Figura 1.17*).

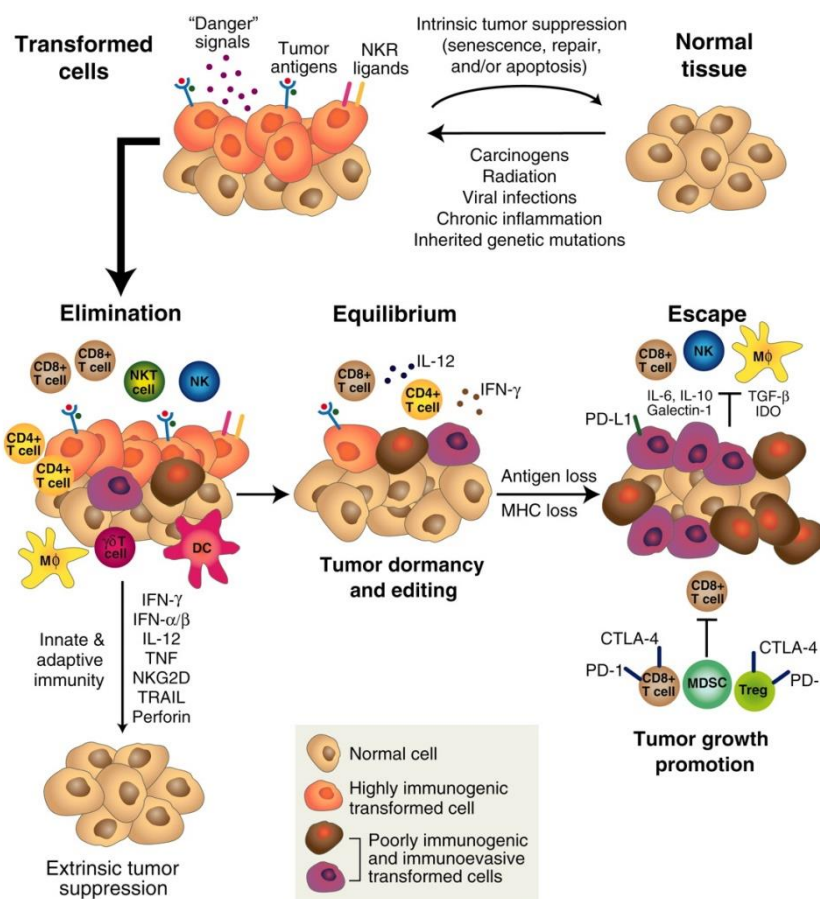


Figura 1.17. Modelo de inmunoección del cáncer. Modificado de (Schreiber, Old, & Smyth, 2011)

#### 1.4.4.3 Mecanismos de resistencia de los tumores al Sistema Inmunitario

Tanto por sus propias mutaciones como por la modulación del TME, los tumores poseen múltiples maneras de generar resistencia al SI. Uno de los mecanismos principales es la **pérdida del reconocimiento del tumor por parte del SI**, que puede implicar varios mecanismos:

- **Menor expresión del MHC-I.** El MHC-I, o HLA-I en humanos (HLA-A, -B y -C) es una molécula de presentación antigénica crucial para el reconocimiento y el ataque de los CTL. La disminución en la expresión en superficie de este complejo merma la acción de dichos linfocitos y es común en muchos tipos de tumor, especialmente en los metastásicos (Garrido, Cabrera, & Aptsiauri, 2010). Una de las formas que poseen de disminuir su expresión es a través de la pérdida de la sensibilidad al IFN-γ liberado por los CTL y las células NK (Weber & Rosenberg, 1988). Adicionalmente, se ha observado que la pérdida parcial, pero no total, de la expresión del HLA-I es indicativa de peor pronóstico. Esto es debido a que expresar algo de este complejo les permite no sólo evitar mejor la acción de los CTL, sino además tener lo suficiente como para inhibir la acción de las células NK a través de sus receptores KIR (Watson et al., 2006).

- **Expresión de receptores mortales mutados.** Se ha descrito también que los tumores pueden expresar formas truncadas de receptores mortales como DR5 o Fas, lo cual evita la transducción de señal apoptótica en la célula diana (Vesely, Kershaw, Schreiber, & Smyth, 2011).
- **Pérdida de expresión de receptores de NKG2D.** Finalmente, se ha observado que la expresión de varios de los receptores de activación del ligando NKG2D de las células NK, como MICA, MICB o ULBP1, pueden encontrarse disminuidos en los tumores (Schmiedel & Mandelboim, 2018). Esto implica la inclinación del balance activación/inhibición de las células NK hacia la supresión de la acción contra el tumor.
- Otra forma que usualmente aplican los tumores para resistir el ataque del SI es el **aumento en la expresión de proteínas anti-apoptóticas**. Estas proteínas impiden la continuación de la cascada apoptótica en variadas etapas. Se ha descrito la sobreexpresión de muchas de estas proteínas, de entre las que destacan c-FLIP en la vía extrínseca (Kim et al., 2002), varias proteínas de la familia Bcl-2 como Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 o Mcl-1 en la vía intrínseca (Hata, Engelman, & Faber, 2015) y XIAP para ambas rutas apoptóticas (Krajewska et al., 2003).
- **Refuerzo de los puntos de control inmunitarios.** Además de las proteínas de superficie ya mencionadas que pueden regular la acción de los linfocitos, existen otras adicionales que inhiben su acción, los llamados puntos de control inmunitarios (del inglés *immune checkpoints*). De entre ellos, destacan dos: la interacción de PD-L1 de los tumores con el receptor PD-1 de las células efectoras y la de CTLA-4 (de los linfocitos T), que se une a CD28, inhibiendo así la co-estimulación. Las células normales no suelen expresar ligandos de PD-1, sin embargo, muchos tipos de tumores sí lo hacen, en concreto en respuesta al IFN- $\gamma$  (Patel & Kurzrock, 2015). Respecto a CTLA-4, su expresión está aumentada en los linfocitos T<sub>reg</sub>. La diferenciación a esta subclase puede estar, a su vez, controlada por la exposición de un ambiente inmunosupresor en el TME (A. Tanaka & Sakaguchi, 2017), como se comentará en este mismo Apartado.

Por último, las propias células tumorales y el TME que las rodea les permite reclutar y modular las células del SI a su favor, creando globalmente un **TME inmunosupresor**. De entre las células del TME que influyen negativamente en la respuesta inmune al tumor se encuentran: DC's tolerogénicas (menor expresión de moléculas co-estimuladoras y producción de IL-10), linfocitos T<sub>reg</sub>, neutrófilos asociados al tumor, macrófagos asociados al tumor (cambian a fenotipo M2, secretando IL-10, VEGF o TGF- $\beta$ ) y células supresoras derivadas de mieloides (promueven

angiogénesis y el proceso de EMT) (Hui & Chen, 2015). Los mecanismos para la generación de este TME inmunosupresor no están del todo aclarados, pero algunos factores pueden ser los siguientes:

- El estado de **hipoxia** en el que crecen los tumores les permite la secreción de quimioquinas, como CCL28, que reclutan a linfocitos  $T_{reg}$  al estroma (Facciabene et al., 2011). Estos  $T_{reg}$  ejercen su acción inmunosupresora a través de la secreción de la citoquina IL-10 y TGF- $\beta$ , expresión de CTLA-4 y PD-L1 y consumo de la citoquina estimuladora IL-2 (Y. Liu & Cao, 2016b).
- La **secreción de lactato** de las células cancerosas y la consecuente **acidificación del medio** también influyen negativamente en el ataque a los tumores: inhibe la capacidad citolítica de los CTL y polariza a las DC's y a los macrófagos al fenotipo inmunosupresor M2 (Huber et al., 2017).

#### ***1.4.4.4 Posible papel del Sistema Inmunitario en la metástasis***

Recientemente se ha sugerido que, una vez que las células tumorales han vencido la acción antitumoral del SI, éste puede incluso contribuir a la generación de metástasis mediante los siguientes mecanismos:

- Como se ha mencionado en el apartado anterior, células del TME como los macrófagos asociados al tumor o las células supresoras derivadas de mieloides secretan factores proangiogénicos, favoreciendo el proceso de **EMT** (Hui & Chen, 2015).
- La **circulación por el torrente sanguíneo** y la **extravasación** suponen pasos limitantes para el proceso de metástasis. Algunas células del SI pueden ayudar a ese objetivo mediante varios mecanismos, como la protección por parte de los linfocitos  $T_{reg}$  al ataque de las células NK o la secreción de fibrina de los macrófagos asociados al tumor para formar redes que anclan a las CTC's a los sitios donde se extravasarán (Kitamura et al., 2015).
- Como se ha explicado en el *Apartado 1.1.4.2*, el tejido secundario donde crecerá el tumor es previamente preparado para facilitar la llegada de las CTC's, lo que se conoce como el **nicho pre-metastásico**. Varias células del SI parecen regular el proceso. Quimioquinas secretadas por las CTC's atrapadas en la pared de los vasos sanguíneos, como CCL2, atraen la llegada de macrófagos asociados al tumor al tejido cercano, que a su vez favorecen la angiogénesis hacia el vaso sanguíneo y la llegada de linfocitos  $T_{reg}$  a través de la secreción de CCL22. Las CTC's atrapadas también atraen a los neutrófilos asociados al tumor, que ayudan a la extravasación y proliferación de las células tumorales en el

tejido secundario. Finalmente, la presencia de todos estos componentes inmunosupresores del SI, así como el ambiente hipóxico, generan un nicho pre-metastásico favorable para el tumor (Y. Liu & Cao, 2016a).

No obstante, el proceso de EMT en los tumores provoca una remodelación en la expresión de proteínas (ver *Apartado 1.1.4.1*), que puede ser aprovechado por las células NK para atacarlos. Por ejemplo, la pérdida parcial o total del MHC-I en superficie en los tumores es uno de los mecanismos más conocidos de escape del ataque de los CTL (Garrido, Algarra, & Garcia-Lora, 2010), pero a su vez provoca un mayor reconocimiento por parte de las células NK. Además de esto, se ha demostrado recientemente que la modulación en la expresión de E-cadherina y de la proteína de adhesión celular 1 (CADM1) durante la EMT también favorece la susceptibilización a las células NK (Chockley et al., 2018).

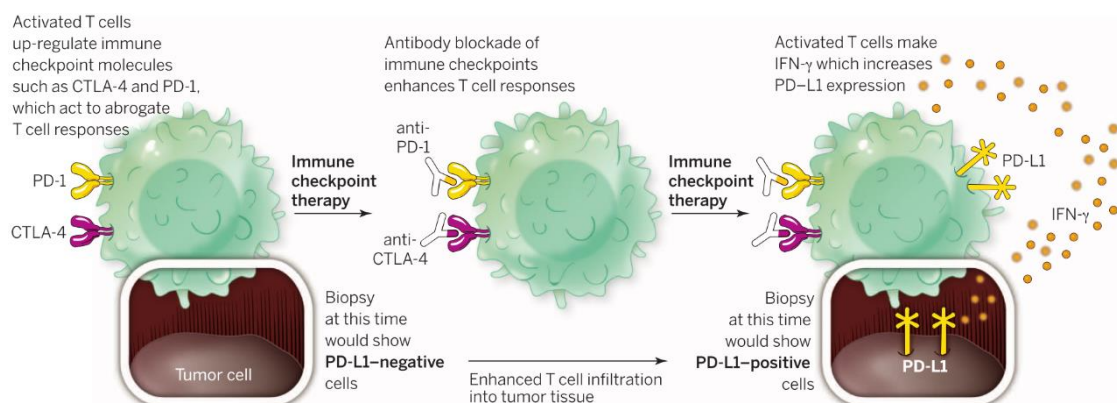
### 1.4.5 Inmunoterapia del cáncer

La *inmunoterapia del cáncer* es un tipo de tratamiento que consiste en mejorar o reponer el SI del organismo para frenar o eliminar al tumor existente. En los últimos años, la inmunoterapia ha realizado grandes avances en la lucha contra el cáncer, consiguiendo buenos resultados contra varios tipos de cáncer en multitud de ensayos clínicos en pacientes, además de ser seleccionada por la revista *Science* como el “avance del año” en 2013, así como por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) en 2016 (H. Zhang & Chen, 2018). De hecho, el Premio Nobel de Fisiología y Medicina del pasado año 2018 recayó sobre algunos de los científicos que habían realizado un trabajo pionero sobre los puntos de control PD-1/PD-L1 y CTLA-4: Tasuku Honjo y Jim Allison, respectivamente ("The Nobel Prize in Physiology or Medicine," 2018). Existen varias modalidades de inmunoterapia, las cuales se explicarán a continuación.

***Anticuerpos monoclonales (mAb's) contra el tumor.*** En este tipo de terapia, se utiliza un mAb que reconoce un marcador o un antígeno tumoral y se une a él, de forma que las células tumorales quedan marcadas con este mAb y así, las células del SI la pueden reconocer mejor para su eliminación mediante ADCC, por la vía del complemento o por fagocitosis. Las dianas de estos mAb's son variadas, como marcadores de superficie específicos o no de tumor, receptores de interleucinas y receptores de factores de crecimiento. Además, tanto el bloqueo de estos dos últimos receptores, como el uso de mAb's contra las propias interleucinas o factores de crecimiento solubles, inducen adicionalmente el bloqueo proliferativo de los tumores por sí mismos (S. Singh et al., 2018). Estos mAb's se vienen usando desde hace años en la terapia antitumoral, como por ejemplo rituximab (anti-CD20) en la terapia del linfoma no Hodgkin o la

leucemia linfocítica crónica o trastuzumab (anti-HER2) en la terapia del cáncer de mama (Sliwkowski & Mellman, 2013).

**Inhibidores de puntos de control.** Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los grandes éxitos de la inmunoterapia en los últimos años ha sido gracias al desarrollo de inhibidores de varios puntos de control de la supresión de la actividad de las células del SI (*¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*). Concretamente, se han desarrollado mAb's que bloquean la unión de CTLA-4 con CD80/CD86 o la de PD-1 con PD-L1, tales como ipililumab y tremelimumab (anti-CTLA-4) o pembrolizumab y nivolumab (anti-PD-1), todos ellos con sorprendentes efectos anti-tumorales, sobre todo en melanomas avanzados o cáncer de pulmón (Webb et al., 2018) (ver Figura 1.18).



**Figura 1.18.** Cómo la terapia contra inhibidores de puntos de control mejora la respuesta de los CTL (Sharma & Allison, 2015).

**Factores inmunomoduladores.** Las citoquinas como otras moléculas pueden tanto activar como inhibir la acción de los componentes del SI. Algunas de ellas, como la IL-2 está aprobada para su uso en melanoma avanzado y cáncer renal metastásico, así como IFN-α para tricoleucemia. Otros factores como IL-12 o IL-15 se están estudiando en la clínica. No obstante, sus efectos no han demostrado ser siempre los deseados, ya que no siempre alcanza las concentraciones necesarias en el tumor y, además, generan efectos secundarios. Por tanto, se está investigando su combinación con otros tipos de terapia anti-tumoral (Waldmann, 2018).

**Terapia celular adoptiva.** La terapia celular adoptiva consiste en el aislamiento de los linfocitos T o de células NK del paciente para estimularlos y expandirlos *ex vivo* con el objetivo de obtener células inmunitarias con mayor capacidad de atacar al tumor existente. Estos linfocitos pueden ser estimulados con antígenos tumorales específicos para generar su expansión clonal. Una de las modalidades más conocidas de la terapia celular adoptiva y que mejores respuestas está generando en clínica es el uso de células T con receptores de antígeno quimérico (CAR-T's). Mediante ingeniería genética, se induce la expresión de un receptor quimérico en los linfocitos T

donde el dominio de unión a ligando está formado por un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo que reconoce a una molécula de superficie del tumor, la parte transmembrana es de CD8, y contiene una parte intracelular con secuencias implicadas en la transducción de señal del CD3-2, de CD28 y/o de CD137 (Porter, Levine, Kalos, Bagg, & June, 2011). Por el momento, el uso de CART's anti-CD19 ha dado buenos resultados en pacientes de leucemias y linfomas de células B (J. C. Yang & Rosenberg, 2016). Otras aproximaciones de terapia celular adoptiva son las siguientes:

- El uso de linfocitos T infiltrados en el tumor, expandidos *in vitro* y reinfundidos al paciente (Gros et al., 2014) (Rosenberg, Spiess, & Lafreniere, 1986).
- El uso de células NK alogénicas, cuya acción no va a ser contrarrestada por el HLA-I del tumor (Morvan & Lanier, 2016), que pueden ser activadas y expandidas *in vitro* (Sánchez-Martínez et al., 2016) (Sánchez-Martínez et al., 2018).
- Recientemente, se ha propuesto también utilizar células NK para expresar CAR (J. Han et al., 2015), y existen algunos ensayos clínicos en marcha.

**Vacunas terapéuticas.** Más allá de las vacunas que ya existen para prevenir los cánceres iniciados por infección vírica (*virus oncogénicos*, como el virus del papiloma humano o el virus de la hepatitis B), otro esfuerzo en la inmunoterapia es la de inyectar vacunas que contengan antígenos tumorales adyuvantes para generar una respuesta inmune contra el tumor. Muchos de estos antígenos tumorales consisten en péptidos derivados de proteínas que sí se pueden encontrar en células sanas, pero que están sobreexpresadas en células tumorales. Varios ensayos clínicos se han llevado a cabo a lo largo de estas dos últimas décadas, por ahora no con demasiado éxito, aunque se sigue investigando al respecto por el potencial futuro que podría tener (Finn, 2018).

La inmunoterapia es un campo en auge y en continua evolución. Los recientes éxitos de su uso contra los tumores vienen a resaltar la importancia de la investigación para el avance contra las enfermedades, así como del SI como herramienta para combatirlo. El desarrollo de terapias, utilizando nuevos fármacos y/o la combinación de otros ya existentes puede suponer una nueva esperanza contra esta aparente eterna lucha contra el cáncer.

## 1.5 TUMORES DE ORIGEN HEMATOLÓGICO

Los tumores hematológicos son aquellos que tienen origen en células del tejido sanguíneo, es decir, en la médula ósea y en los ganglios linfáticos. Actualmente, las neoplasias hematológicas se dividen en dos grandes grupos: las que tienen origen en la médula ósea, o *mieloides*, y las que tienen su origen en linfocitos, o *linfoides* (Vardiman et al., 2009). Constituyen entre el 10-15% del total de cánceres. Debido a la variedad de células posibles de las que pueden derivar, los tumores hematológicos constituyen un grupo muy heterogéneo de neoplasias, con cuadros clínicos, diagnósticos y pronóstico distintos entre ellos.

Una de las formas clásicas de tratar a pacientes con este tipo de tumores es mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas semialogénicas, aumentando de esta manera la supervivencia de los enfermos. No obstante, el propio paciente eventualmente genera de nuevo células tumorales hematológicas, conduciendo a un relapso que termina siendo la principal causa de fracaso del trasplante o fallecimiento del paciente (Im & Pavletic, 2017). Por consiguiente, mejoras en esta técnica y nuevos tratamientos se siguen investigando para tratar con mayor eficacia este tipo de neoplasias.

En el presente trabajo, se ha trabajado con dos tipos de neoplasias hematológicas:

### 1.5.1 Leucemia linfocítica crónica de tipo B (B-CLL)

La leucemia linfocítica (o linfática) crónica de tipo B (B-CLL) es un tipo de neoplasia que se caracteriza por la acumulación y proliferación de linfocitos B maduros en la sangre, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. Es una enfermedad que afecta principalmente a personas de edad avanzada, siendo la media aproximada de los pacientes de 70 años, y con un pronóstico muy variable, en función de la alteración genética que presente el tumor y el estado físico de la persona (Kipps et al., 2017).

#### 1.5.1.1 Características de la B-CLL

La transformación de estas células comienza en la mayoría de los casos por **alteraciones cromosómicas** con las que adquieren una mayor resistencia a la apoptosis. Las más comunes de ellas, por orden de incidencia, son: deleciones en el brazo largo del cromosoma 13 (cerca del 55%; especialmente, la deleción 13q14), deleciones en el brazo largo del cromosoma 11 (siendo la deleción 11q23 la más frecuente), trisomía del cromosoma 12 y deleciones en el brazo corto del cromosoma 17 (sobre todo, la deleción en 17p13, donde está localizado el gen que codifica p53). También son habituales mutaciones o cambios en el número de copias de otros genes, tales como los que codifican proteínas de la familia de Bcl-2, Notch-1, Atm o la mencionada p53.



Además de esto, las células B malignas se caracterizan por la expresión de marcadores de superficie como CD5, CD19 y CD23, así como la disminución de otros como CD20 y CD79b (Hallek, 2017).

El **diagnóstico** de esta neoplasia se realiza si se detecta un conteo de más de 5000 linfocitos/ $\mu$ l y posterior confirmación del fenotipo mediante citometría de flujo. Estas células poseen un tamaño pequeño y con el núcleo más grande y denso que los linfocitos sanos (Hallek et al., 2008).

Respecto a la **sintomatología**, al comienzo de la enfermedad, el paciente es asintomático. No obstante, conforme pasa el tiempo, las células malignas van expandiéndose y comienzan a aparecer los síntomas, tales como: inflamación de los ganglios linfáticos, del bazo y del hígado, fiebre, fatiga, sudoración excesiva, pérdida de peso o infecciones recurrentes, entre otros.

### 1.5.1.2 Tratamientos para la B-CLL

Aunque actualmente se trate de una enfermedad incurable, se han hecho y se siguen haciendo múltiples esfuerzos para, al menos, controlar su evolución. Clásicamente, la monoterapia con **agentes quimioterapéuticos**, especialmente el clorambucil, supuso durante muchos años el tratamiento estándar contra la B-CLL. Otros agentes alquilantes, como fludarabina, ciclofosfamida o bendamustina también son utilizados en la clínica (Rai & Jain, 2016). No obstante, el gran avance en el entendimiento de esta enfermedad, así como de la aparición de terapias dirigidas y de la inmunoterapia, ha permitido desarrollar nuevos tratamientos en solitario o en combinación con la quimioterapia (Figura 1.19).

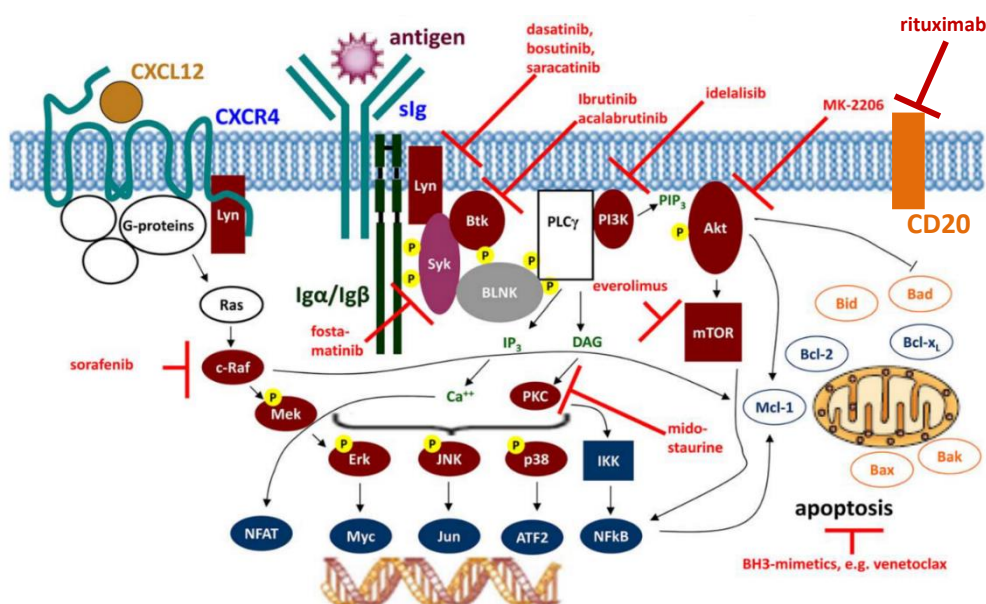


Figura 1.19. Dianas de terapias dirigidas e inmunoterapia contra la B-CLL. Modificado de (Hallek, 2017).

Uno de estos tratamientos consiste en el uso de **mAb anti-CD20**, como rituximab, obinutuzumab y ofatumumab. Se han realizado múltiples ensayos clínicos utilizando estos mAb's en combinación con los quimioterapéuticos arriba mencionados, obteniendo mejor tasa de supervivencia libre de progresión en todos los casos, y consiguiendo, de hecho, la aprobación por parte de la FDA para el uso de cualquiera de estos 3 mAb con quimioterapia como primera línea de tratamiento para B-CLL (Kipps et al., 2017).

Otra estrategia comúnmente estudiada es la del **bloqueo de la señalización del BCR**. La ruta del BCR en los linfocitos B juega un papel importante en la supervivencia de estas células, por lo que constituye una diana atractiva para el desarrollo de fármacos contra neoplasias de este tipo (Burger & Chiorazzi, 2013). Los fármacos más utilizados hasta la fecha son el ibrutinib y el idelalisib. El **ibrutinib** bloquea la tirosina quinasa de Bruton (BTK), enzima que se encuentra en la cascada de señalización del BCR. Su activación constitutiva fomenta la patogenicidad del tumor. Este fármaco ha demostrado ser efectivo en ensayos clínicos para el tratamiento de B-CLL, siendo aprobado como segunda línea de tratamiento (Advani et al., 2013). A pesar de ello, se han observado cierta toxicidad e inespecificidad de este fármaco, de modo que sus efectos adversos se están estudiando, a la par que su combinación con otros mAb's o agentes de quimioterapia (Rai & Jain, 2016). El **idelalisib** es un inhibidor de la isoforma  $\delta$  de la PI3K. Este fármaco actúa indirectamente en la ruta de señalización del BCR, afectando a la supervivencia de las células de B-CLL e inhibiendo la secreción de quimioquinas (Hoellenriegel et al., 2011). Su uso en ensayos clínicos ha dado buenos resultados generalmente, aunque con efectos secundarios, por lo que su uso se está investigando en combinación con otros fármacos, como rituximab u ofatumumab (Ferrer & Montserrat, 2018).

Finalmente, se está investigando otra diana como la **inhibición de proteínas de la familia de Bcl-2**, con el uso del mimético de BH3 **venetoclax**, para su uso contra la B-CLL, dando buenos resultados como monoterapia en pacientes con deleciones en el cromosoma 17, población con mal pronóstico de la enfermedad (Stilgenbauer et al., 2016).

### 1.5.2 Mieloma múltiple (MM)

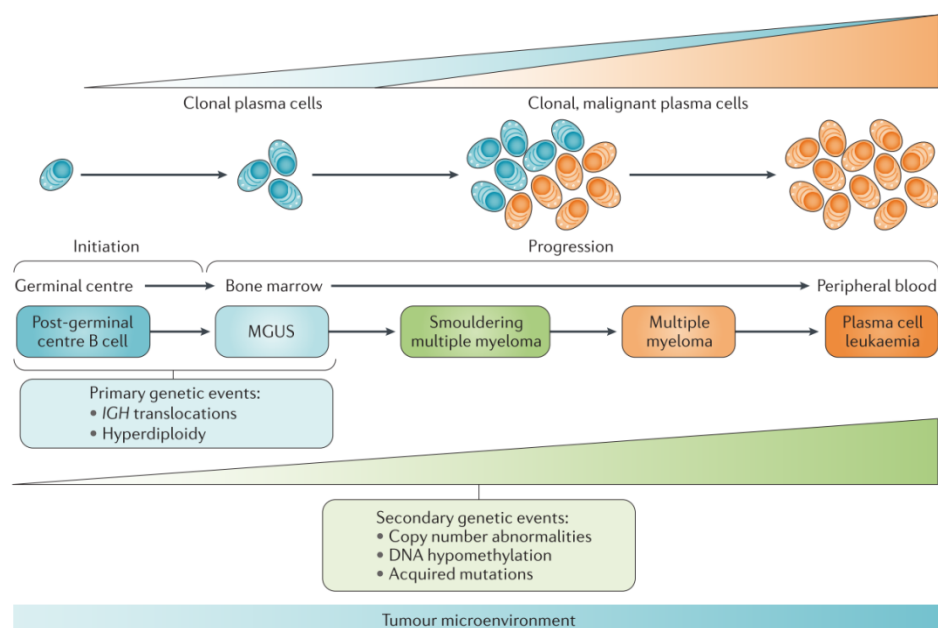
El mieloma múltiple (MM) es un tipo de tumor hematológico en el que se acumulan células plasmáticas totalmente diferenciadas en la médula ósea, aunque también pueden ser detectables en la sangre periférica u otros tejidos extramedulares. El MM se encuentra dentro del grupo de patologías conocidas como *gammopatías monoclonales*.

#### 1.5.2.1 Características del MM

El mieloma múltiple se caracteriza principalmente por la secreción continua por parte de las células tumorales de un anticuerpo monoclonal, que se denomina **proteína M**, detectable en suero y orina. Otros parámetros que caracterizan al MM es la infiltración de células plasmáticas en la médula ósea, expresión de CD38 y varias características clínicas, utilizadas en su conjunto como diagnóstico de la enfermedad (Rajkumar et al., 2014). Respecto a la **sintomatología**, los pacientes pueden ser inicialmente asintomáticos, aunque acaban manifestando habitualmente infecciones recurrentes, anemia, osteopenia o fallo renal (Röllig, Knop, & Bornhauser, 2015).

La **etiología** de esta enfermedad es desconocida. A pesar de ello, varios estudios se han realizado para tratar de encontrar posibles causas. La exposición a factores ambientales o laborales como la radiación, pesticidas o tintes para el pelo se han investigado, aunque con poca evidencia que apoye esas teorías. Asimismo, estudios de asociación de genoma completo sí han demostrado la correlación entre ciertas variaciones en el *loci* de algunos genes con un aumento en el riesgo de padecer esta enfermedad. En cualquier caso, para que esta enfermedad se origine, deben ocurrir **alteraciones cromosómicas** en el *loci* de las inmunoglobulinas (especialmente en los de la cadena pesada), así como en los cromosomas 1, 13 o 17, que den lugar a la activación de oncogenes (Kumar et al., 2017).

Se ha demostrado de manera consistente que, para alcanzar el estado de MM, las células plasmáticas deben pasar por una **serie de estadios**, marcados en parte por las alteraciones en el DNA comentadas (*Figura 1.20*). En el primer estadio, las células plasmáticas transformadas se consideran como una gammopatía monoclonal de significado incierto (MGUS), caracterizada por la infiltración de células plasmáticas en la médula ósea y secreción de proteína M. Esta fase es asintomática y se estima que el 15% de pacientes con MGUS acaban desarrollando MM. Además de esto, antes de llegar a convertirse en MM, la MGUS puede pasar por otro estadio intermedio conocido como mieloma múltiple quiescente (SMM) (Landgren et al., 2009).



**Figura 1.20.** Estadios de desarrollo en las gammopatías monoclonales (Kumar et al., 2017).

### 1.5.2.1 Tratamiento del MM

Debido a la heterogeneidad de las mutaciones y a las características de cada paciente, el MM es una enfermedad que se desarrolla de forma muy variable, oscilando la esperanza de vida del paciente desde unas pocas semanas tras el diagnóstico hasta 10 años. Al igual que en la B-CLL, se trata de una enfermedad actualmente incurable (Ashjian & Redic, 2015). A pesar de ello, la esperanza de vida media ha aumentado de los 3 a los 6 años en los últimos tiempos (Röllig et al., 2015), gracias al desarrollo de nuevas terapias, como las que se comentarán a continuación.

Desde hace décadas, la primera opción para tratar al paciente consiste en la posibilidad o no de poder realizar un **trasplante de células madre hematopoyéticas autólogas**, técnica que ha demostrado incrementar la supervivencia de los pacientes. La elegibilidad para este tipo de trasplante viene condicionada por la edad del paciente, así como por su historial de fallo renal o de diabetes tipo 2, que podrían complicar su recuperación (Koniarczyk, Ferraro, & Miceli, 2017).

En la actualidad, y desde hace unos 10 años, el tratamiento más común al inicio de la enfermedad es la **combinación** de un **inhibidor del proteasoma** (siendo bortezomib y carfilzomib los más habituales) con **fármacos inmunomoduladores**, como talidomida, lenalidomida o dexametasona. Otras combinaciones de estos fármacos con quimioterapéuticos tales como melfalán o ciclofosfamida también se utilizan, en función del estadio de progresión de la enfermedad y de la elegibilidad o no del paciente para el trasplante (Kumar et al., 2017).

El campo de la *inmunoterapia* también ha permitido el avance en el tratamiento contra el MM, habiéndose aprobado ya el uso del **anticuerpo** anti-CD38 daratumumab como segunda línea de tratamiento (Palumbo et al., 2016). Otras aproximaciones de inmunoterapia se encuentran en ensayos clínicos, como el mAb anti-SLAMF7 elotuzumab o la combinación de fármacos como lenalidomida con **inhibidores de punto de control**, especialmente de PD-1/PD-L1 (nivolumab y pembrolizumab). Se está ensayando también el uso de vacunas terapéuticas y terapia celular adoptiva con tecnología CAR-T (Rodríguez-Otero, Paiva, Engelhardt, Prosper, & San Miguel, 2017).



# ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

---





## 2.1 USO COMBINADO DE FÁRMACOS METABÓLICOS CON INMUNOTERAPIA

Una de las estrategias conocidas en la inmunoterapia de los tumores es el uso de factores inmunomoduladores, que actúan sobre el SI para promover su acción contra el tumor (ver *Apartado 1.4.5*). No obstante, otra opción menos explorada es la de modular la expresión de receptores u otras moléculas del propio tumor para hacerlo más sensible a la acción antitumoral de las células efectoras del SI. Nuestro grupo de investigación, junto con el de Martín Villalba, del INSERM en Montpellier (Francia), ha explorado el uso de fármacos que alteran el metabolismo de las células cancerosas en este contexto (Villalba et al., 2014). Por ejemplo, tanto el DCA como la metformina son capaces de aumentar la expresión del MHC-I en los tumores (Charni et al., 2010; Oliveras-Ferraro et al., 2012), haciéndolos así potencialmente más sensibles a la acción de los CTL (Catalán et al., 2015). Asimismo, aunque de forma distinta, ambos fármacos activan a la enzima AMPK, la cual es capaz de actuar sobre múltiples vías de señalización celulares (Faubert et al., 2015). El uso de estos dos fármacos contra el cáncer se ha estudiado ampliamente, aunque sus efectos parecen inducir más bien la sensibilización del tumor a otras terapias y no exhiben una acción citotóxica por sí mismos (ver *Apartado 1.2.3.6*). En relación con esto, se ha observado que los tumores responden mejor a la acción de fármacos citotóxicos si sus mitocondrias están más predispuestas a responder a uno de esos estímulos, como si estuvieran cerca de un *umbral apoptótico* (Ni Chonghaile et al., 2011). Tanto el DCA como la metformina son fármacos que actúan sobre la mitocondria, alterando su funcionamiento y remodelando el metabolismo energético celular, acercando potencialmente a las células tumorales a dicho umbral.

Respecto a los tumores de origen hematológico, la quimioterapia sigue siendo una de las primeras opciones de tratamiento, generando efectos secundarios no deseados, y manteniéndose aún así como enfermedades incurables. Por tanto, la búsqueda de tratamientos alternativos con pocos efectos secundarios sigue siendo una necesidad para esta clase de tumores.

Por todo ello, la combinación de estos fármacos, baratos y con pocos efectos secundarios, para sensibilizar a los tumores de origen hematológico a la inmunoterapia basada en CTL o en células NK es una posibilidad que merece la pena explorar.

## 2.2 USO COMBINADO DEL DCA CON IBRUTINIB EN TUMORES DE ORIGEN HEMATOLÓGICO

En relación con lo comentado en el Apartado anterior, otra alternativa a los tratamientos actuales contra los tumores de origen hematológico es el uso combinado de fármacos, para potenciar la acción de los mismos y obtener mejores resultados. El fármaco *DCA*, como se acaba de exponer, es un compuesto cuyo efecto potencial sobre las células, además de citostático, es de acercarlas a un umbral apoptótico (Ni Chonghaile et al., 2011) para facilitar la inducción de muerte por parte de otro fármaco o terapia. De hecho, ya se ha estudiado con anterioridad el uso del *DCA* en combinación con otros fármacos en células de B-CLL (Allende-Vega et al., 2015; Voltan, Rimondi, Melloni, Gilli, et al., 2016) y de mieloma múltiple (Allende-Vega et al., 2015; Sanchez et al., 2013).

Por otra parte, el ibrutinib es un fármaco inhibidor de la enzima BTK cuyo uso se ha aprobado recientemente en pacientes de B-CLL (Advani et al., 2013) y está en fase de ensayos clínicos en mieloma múltiple (Richardson et al., 2018), entre otros tumores hematológicos. A pesar de obtener buenos resultados en general, este compuesto puede generar ciertos efectos secundarios, por lo que se está estudiando emplearlo en combinación con otros fármacos (Stilgenbauer et al., 2016; Voltan, Rimondi, Melloni, Rigolin, et al., 2016).

Así pues, otra alternativa de terapia anti-tumoral que se propuso ensayar fue la combinación del fármaco metabólico *DCA* como agente sensibilizador a la acción del inhibidor de la enzima BTK ibrutinib en células tumorales de B-CLL y mieloma múltiple.

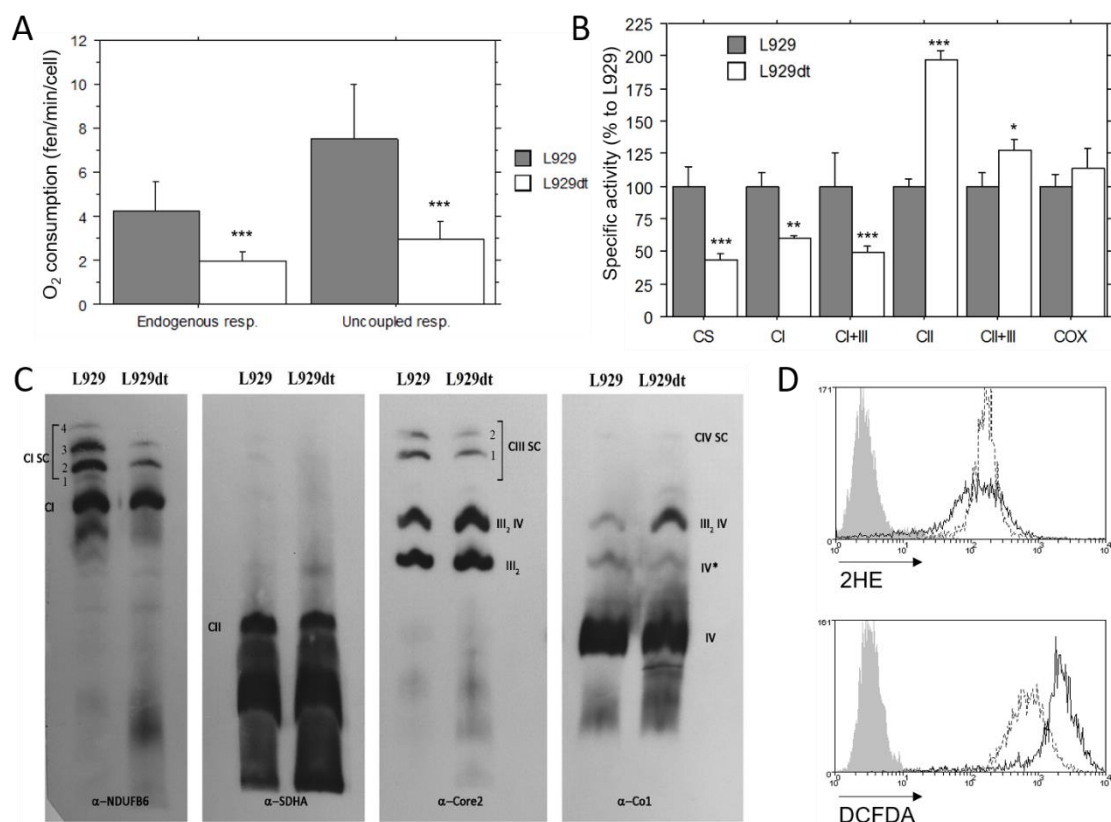
## 2.3 LA LÍNEA CELULAR L929dt COMO MODELO DE METÁSTASIS *IN VITRO*

Tal como se ha visto durante la *Introducción*, el estudio de la metástasis, tanto a nivel conceptual como a nivel de posibles tratamientos, es complejo y está en continuo desarrollo. La malignidad y la heterogeneidad con la que cursa, así como la falta de modelos celulares claro para su estudio contribuye a esta complejidad.

Nuestro grupo ha generado una línea celular tumoral derivada de la línea transformada de fibroblasto de ratón L929, que se caracteriza por crecer despegada de la placa de cultivo y no expresar MHC-I en superficie, denominada *L929dt*, del inglés “*detached*” (Catalán et al., 2015). Tanto la desadherencia de la placa de cultivo, como la pérdida de expresión del MHC-I y la incapacidad de realizar OXPHOS correctamente son características que se asemejan a lo que ocurre en células en estadio de metástasis, y podría ser una línea celular que sirviera como modelo para estudiar este proceso. Ante esta sospecha, se realizaron análisis posteriores para

caracterizar su fenotipo glucolítico (Marco, 2015). Estos estudios demostraron varias diferencias respecto a las células parentales:

- Una capacidad respiratoria mitocondrial muy limitada (*Figura 2.1A*).
- Una severa disfunción en la formación y actividad de los supercomplejos mitocondriales, especialmente en la incorporación del C.I a SC's (*Figura 2.1B-C*).
- Una variación en la cantidad de ROS libres en la célula (*Figura 2.1D*).



**Figura 2.1.** Caracterización de la funcionalidad OXPHOS de la línea L929dt respecto a sus parentales L929. (A) Consumo de O<sub>2</sub> endógeno y desacoplado. Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de n=6 (resp. Endógena de L929), n=7 (resp. máxima de L929) y n=8 (L929dt); (B) Actividad específica de la citrato sintasa (CS) y de los complejos respiratorios I (CI), I+III (CI+III), II (CII), II+III (CII+III) y IV (COX) mediante espectrofotometría. n $\geq$ 2; (C) Western-Blotting de los complejos I ( $\alpha$ -NDUFB6), II ( $\alpha$ -SDHA), III ( $\alpha$ -Core2) y IV ( $\alpha$ -Co1) de la mETC. Se extrajeron las mitocondrias de ambas líneas celulares y se realizó un BNGE; después, se transfirieron las proteínas separadas a una membrana y se realizaron los inmunoblots; (D) Formación de ROS en estado basal tras marcaje con DHE y DCFDA. Los histogramas grises representan las células sin marcar y los histogramas en línea continua y discontinua las células L929 y L929dt marcadas, respectivamente. \*p<0,05; \*\*p<0,03; \*\*\*p<0,01.

El fenotipo Warburg que despliegan las células L929dt se asemeja al concepto general de alto consumo de glucosa característico de las células metastásicas (W. Duan et al., 2014). Además de esto, las disfunciones en el C.I que presentan, también correlacionan con el rol que posee este complejo como mediador del metabolismo energético en las distintas fases de progresión tumoral (Gasparre, Porcelli, Lenaz, & Romeo, 2013) (Urra, Muñoz, Lovy, & Cárdenas, 2017) (ver

*Tabla 1.1*). Por último, los cambios observados en la formación de ROS en estas células podrían relacionarse con los procesos de remodelación metabólica asociadas a la EMT durante la metástasis (Piskounova et al., 2015).

Así pues, las pruebas encontradas hasta ahora parecen indicar que las células L929dt podrían considerarse como un modelo de metástasis *in vitro*. Por ello, es de gran interés la caracterización completa de estas células para ratificar esta hipótesis.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado en estos dos apartados de esta sección, se plantearon los siguientes **objetivos** para esta Tesis Doctoral:

- Utilizar los fármacos DCA y metformina como agentes sensibilizadores de las células tumorales a la acción citotóxica de CTL's y células NK expandidas *ex vivo*, contra líneas celulares de B-CLL y mieloma múltiple.
- Ensayar el posible efecto combinatorio del fármaco DCA con ibrutinib en células tumorales de B-CLL y mieloma múltiple.
- Caracterizar en mayor profundidad la línea celular L929dt como posible modelo de metástasis *in vitro*:
  - Estudiar su capacidad tumorigénica y metastásica *in vivo*.
  - Analizar la contribución del mtDNA a su fenotipo.
  - Comparar los cambios en las rutas de señalización más importantes con la línea celular parental L929.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3.1 CULTIVOS CELULARES

#### 3.1.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas durante este trabajo fueron las siguientes (*Tabla 3.1*):

**Tabla 3.1.** Líneas celulares empleadas.

Línea celular	Tipo celular
L929	Fibroblasto de ratón transformado
L929-p <sup>0</sup>	Derivada de L929
L929dt	Derivada de L929
dt <sup>L929</sup>	Derivada de L929 y L929dt
L929 <sup>dt</sup>	Derivada de L929 y L929dt
B16	Melanoma de ratón
MC57G	Fibrosarcoma de ratón
dt <sup>B16</sup>	Derivada de B16 y L929dt
dt <sup>MC57G</sup>	Derivada de MC57G y L929dt
B16 <sup>dt</sup>	Derivada de B16 y L929dt
MC57G <sup>dt</sup>	Derivada de MC57G y L929dt
K562	Leucemia mieloide crónica
Mec-1	Línea de B-CLL humana
Mec-1 Bcl-x <sub>L</sub>	Derivada de Mec-1
Mec-1 Mcl-1	Derivada de Mec-1
MM.1S	MM humano
U266	MM humano
U937	Linfoma histiocítico humano
PLH	Célula linfoblastoide tipo B humana transformada por EBV

La línea celular L929 y su derivada L929-p<sup>0</sup>, carente de mtDNA (King & Attardi, 1989), fueron cedidas por la Dra. Raquel Moreno (Universidad de Zaragoza); la línea celular L929dt fue generada con anterioridad en este laboratorio (Catalán et al., 2015); las líneas B16, MC57G y K562 fueron proporcionadas por el Dr. Julián Pardo (Centro de Investigación Biomédica de Aragón, Zaragoza); las líneas dt<sup>L929</sup>, L929<sup>dt</sup>, dt<sup>B16</sup>, dt<sup>MC57G</sup>, B16<sup>dt</sup> y MC57G<sup>dt</sup> fueron generadas durante la realización de esta tesis (ver *Apartado 3.3*); la línea Mec-1 [a partir de ahora denominada *Mec-1 WT (Wild Type)*] fue cedida por la Dra. Dolors Colomer (Hospital Clinic, Barcelona); las líneas Mec-1 que sobreexpresan la proteínas Bcl-x<sub>L</sub> (*Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>*) y Mcl-1 (*Mec-1 Mcl-1*) fueron obtenidas por el Dr. Oscar Gonzalo Martínez en este laboratorio (Gonzalo, 2017); la línea MM.1S fue proporcionada por el Dr. Atanasio Pandiella (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca); la línea U266 fue cedida por el Dr. Antonio Campos (Hospital Puerta del Mar, Cádiz); la línea U937 se obtuvo de la ATCC (*American Type Culture Collection*); y finalmente, la línea PLH fue amablemente cedida por el Dr. Martín Villalba (Institute for Regenerative Medicine & Biotherapy, Montpellier, Francia).

### 3.1.2 Materiales y medios de cultivo celulares

Las líneas celulares L929, B16, MC57G y sus derivadas fueron cultivadas en el medio de cultivo DMEM (Gibco, Invitrogen). Para las líneas celulares Mec-1 y sus derivadas, MM.1S, U266, U937, K562, PLH, así como las células obtenidas de muestras de sangre (*ver Apartado 3.1.4*) se cultivaron en el medio de cultivo RPMI, también de Gibco (Invitrogen). Para ambos casos, los medios de cultivo fueron suplementados con penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (Sigma), GlutaMAX™ (L-glutamina 2 mM, Gibco) y suero fetal bovino (SFB) al 10% (Sigma), denominándose a partir de ahora como RPMI y DMEM completo. Para el caso concreto de las células L929-p<sup>0</sup> y durante la formación de los híbridos transmitocondriales (*ver Apartado 3.3*), se empleó también el medio DMEM completo suplementado con uridina (50 µg/ml, Sigma), denominándose medio DMEM-p<sup>0</sup>.

Los frascos de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup>, así como las placas de 12.5, 60 y 150 cm<sup>2</sup> y las de 6, 12, 24, 48 y 96 pocillos estériles empleadas para el cultivo de estas células fueron adquiridas de la casa TPP. Estas células fueron cultivadas en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% termostatzado a 37°C, de Heraeus Cell.

El manejo de dichas líneas celulares se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar vertical (Telstar). Se utilizaron pipetas de 5, 10 y 25 ml, así como de tubos de fondo cónico de 15 y 50 ml (Corning) para la manipulación y toma de muestras de los cultivos. El azul Trypan, el DMSO y la solución Ficoll-Paque™ fueron adquiridos a Sigma. Para la esterilización de soluciones, se utilizaron filtros de 0.22 µm de tamaño de poro (Acrodisc®) de Pall Corporation y jeringas de la casa Terumo. El material de vidrio, los microtubos de 0.2 y 1.5 ml y las puntas de micropipetas utilizados fueron previamente esterilizados durante 20 minutos a 1 atm de presión en un autoclave (Autoester Mod 4376, Selecta).

### 3.1.3 Mantenimiento de los cultivos celulares

Las líneas celulares fueron sembradas habitualmente a una concentración de 6000 células/cm<sup>2</sup>, en el caso de células adherentes, o de 0.3x10<sup>6</sup> células/ml, en el caso de células en suspensión. Cada 2-3 días, o poco antes de alcanzar confluencia, se realizaron los pases de los cultivos.

#### 3.1.3.1 Contaje y determinación de la viabilidad celular

Para realizar los pases, se despegaron en primer lugar las líneas celulares adherentes de la superficie de cultivo mediante la incubación a 37°C con una solución de tripsina/EDTA (PAN Biotech). Tras ello, se determinó el contaje del número de células y su viabilidad por tinción con



*azul Trypan*. Este colorante es capaz de teñir las células muertas que han perdido la integridad de su membrana, dándoles una tonalidad azulada. Las células vivas o apoptóticas, al mantener íntegra su membrana plasmática excluyen el colorante azul Trypan. Para el conteo se mezcló la suspensión celular, previamente homogeneizada, con una solución de azul Trypan al 0.4% en NaCl 0.15 M en proporción 1:1, se depositó sobre una cámara de Neubauer y se realizó el conteo en un microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i).

La fórmula empleada para el cálculo de la densidad celular fue la siguiente:

$$\text{Densidad celular} \left( \frac{\text{cél}}{\text{ml}} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ de células viables} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10^4}{N^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

Siendo  $10^4$  el factor de corrección del volumen de la cámara.

Además de esto, todos los experimentos fueron llevados a cabo con una viabilidad celular mínima del 90% (porcentaje de células vivas respecto a las células totales del cultivo).

### **3.1.3.2 Congelación y descongelación de células**

Las líneas celulares se almacenaron congeladas en tanques criopreservadores de  $N_2$  líquido (Air Liquide). Para ello, se centrifugaron entre  $5-10 \times 10^6$  células a 340g durante 5 minutos. La fracción precipitada se resuspendió en 0.5-1 ml del medio de cultivo correspondiente con 10% de DMSO y se trasladó este contenido a un criotubo (Nunc®, Thermo Scientific). El criotubo se mantuvo en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante un mínimo de 24 horas antes de trasladarlo al contenedor de  $N_2$  ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), para ser almacenado hasta su uso.

### **3.1.3.3 Detección de micoplasmas en cultivos celulares**

Durante el mantenimiento de los cultivos celulares, se realizó de forma rutinaria un control de presencia de micoplasmas en los mismos. Para ello, se empleó un kit comercial consistente en la amplificación de su DNA por PCR (*Mycoplasma Gel Detection Kit*, Biotools). En caso de ser necesario, se procedió a la eliminación de los mismos empleando una combinación de antibióticos comercial (*BM Cyclin*, Sigma).

### **3.1.4 Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMC) y cordón umbilical (UCB-MC)**

Las muestras de sangre utilizadas en esta Tesis provinieron de tres orígenes distintos:

- Se obtuvieron muestras de sangre de donantes sanos, parcialmente procesadas (*LeukoPaks*), solicitadas a través del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón.

- Se recogieron muestras de sangre de cordón umbilical (UCB), cedidas por el Hospital Universitario de Montpellier (CHRU, Montpellier, Francia).
- Se recogieron muestras de pacientes de B-CLL, proporcionadas por los Dres. Luis Palomera y Gemma Azaceta (Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza).

Para la separación de los PBMC y UCB-MC del resto de componentes de la sangre, se utilizaron tubos de fondo cónico, donde se vertió en primer lugar un volumen de Ficoll-Paque® equivalente al doble de volumen de la muestra. Seguidamente, se diluyó la muestra de sangre a la mitad con tampón fosfato salino (PBS: NaCl 150 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3 H<sub>2</sub>O 8 mM; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.6 mM; pH 7.4) y se añadió cuidadosamente sobre el Ficoll-Paque®, con el objetivo de no mezclar las dos fases. Estos tubos se introdujeron en la centrífuga, donde se centrifugaron a una velocidad de 450g durante 15 minutos y sin deceleración manual. El resultado de este procesamiento es la separación de las MC por la formación de un “anillo” blanco de células en la interfase. Dicha interfase fue recogida en otro tubo cónico, donde se procedió a un lavado de las células mediante la adición de PBS y una nueva centrifugación a 450g durante 5 minutos con freno. Esta fracción celular se resuspendió en medio RPMI completo y se determinó la densidad celular y la viabilidad de los PBMC antes de utilizarlos para los ensayos posteriores.

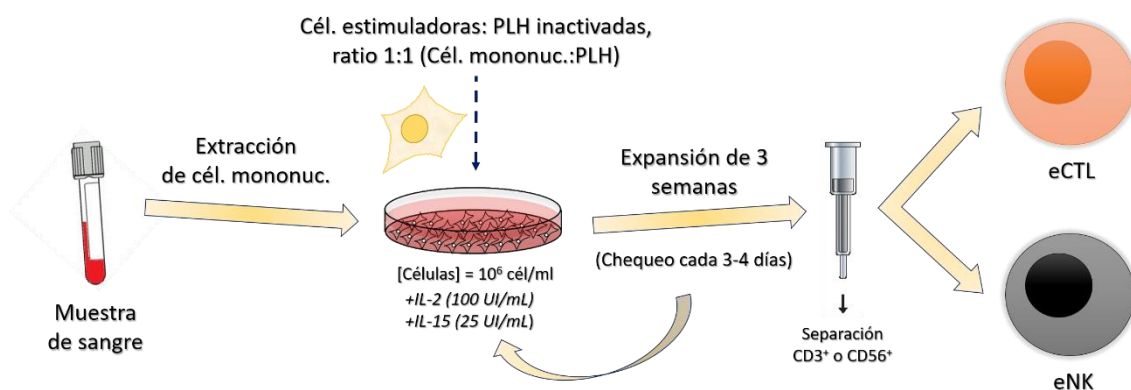
#### **3.1.4.1 Expansión de CTL y células NK in vitro**

Las células mononucleares obtenidas de UCB y de Leukopaks fueron empleadas para la expansión y activación de CTL y células NK, usando protocolos basados en trabajos anteriores de este grupo (Sánchez-Martínez et al., 2016) (Sánchez-Martínez et al., 2018). Debido a la distinta procedencia de estos UCB-MC y PBMC, y al desarrollo de estos protocolos en distintos centros de trabajo, éstos son parecidos en varios aspectos (ver *Figura 3.1*), pero poseen ciertas diferencias:

- Las células mononucleares se cultivaron a una densidad celular de 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI completo.
- Ambos medios fueron suplementados con los factores recombinantes humanos IL-2 (100 IU/ml, Peptrotech) e IL-15 (25 IU/ml, Miltenyi).
- Para ambos protocolos, dichas células fueron estimuladas con la línea celular linfoblastoide transformada con el virus de Epstein-Barr PLH, co-cultivados en un ratio de 1:1. Para evitar el crecimiento de las células estimuladoras, éstas deben ser previamente inactivadas. Para la expansión procedente de UCB, las células estimuladoras fueron inactivadas en un irradiador de rayos-γ (12:45 minutos a 100 Gy; propiedad de CHRU,

Montpellier, Francia). En la expansión procedente de Leukopaks, las células PLH se inactivaron en presencia de mitomicina C (25 µg/ml, Sigma), a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml y en medio RPMI sin suplementar durante 2 horas a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>. Tras un lavado con PBS, se mantuvieron adicionalmente un mínimo de 30 minutos en el incubador para que las células expulsaran la mitomicina C sobrante de su interior. Para ambas expansiones, las células PLH ya inactivadas se introdujeron en co-cultivo con las UCB-MC/PBMC o bien se congelaron en viales de  $10^7$  células para su uso posterior.

- Las expansiones se mantuvieron durante un máximo de 3 semanas, comprobando cada 3-4 días la densidad celular y la distribución de poblaciones en cultivo, renovando el medio de cultivo, las interleucinas, las células estimuladoras y ajustando la densidad celular cuando fuera necesario.



**Figura 3.1.** Esquema del protocolo de expansión general utilizado para obtener eCTL y eNK *in vitro*.

A partir de la primera semana de cultivo, los CTL's y las células NK en cultivo se encontraron lo suficientemente activados para comenzar a ser utilizados en los ensayos de citotoxicidad contra los tumores.

#### 3.1.4.2 Ensayos de citotoxicidad de los eCTL's y las células eNK contra tumores

Para separar ambas poblaciones linfocitarias, se utilizó un kit comercial de selección positiva de la población CD3<sup>+</sup> (EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit, StemCell) o CD56<sup>+</sup> (MicroBeads, Miltenyi). Tras comprobar la separación de las poblaciones en el citómetro de flujo (ver *Apartado 3.10.2*), las células se marcaron con la sonda fluorescente CellTracker™ Green (Life Technologies) o CellTracker™ Violet BMQC (Thermo). Este marcaje intracelular permite diferenciar las células efectoras (eCTL's/eNK's marcadas) de las células diana (tumores, no marcadas), enfrentadas en un mismo pocillo, mediante citometría de flujo. Para el marcaje, se resuspendieron las células efectoras a una concentración de  $2.5 \times 10^6$  cél/ml en PBS y se añadió la sonda fluorescente a 0.5 µM, dejándose incubar durante 15 minutos a 37°C en una estufa de CO<sub>2</sub>.

Pasado este tiempo, se centrifugaron las células 5 minutos a 340g y el pellet resultante se resuspendió en medio RPMI completo. Se dejaron lavar las células en el incubador de CO<sub>2</sub> un mínimo de 30 minutos para eliminar el exceso de marcaje y, seguidamente, se volvieron a centrifugar de la misma forma y se resuspendieron a una concentración de  $0.5 \times 10^6$  cél/ml en medio RPMI completo. Las células efectoras se sembraron sobre las células diana a un ratio de 1:1 (cél. efectora: cél. diana) y se dejaron enfrentar hasta el día siguiente a 37°C en el incubador de CO<sub>2</sub>. Por último, se evaluó al día siguiente la muerte celular producida por las células efectoras por marcaje con 7-AAD en el citómetro de flujo (ver *Apartado 3.10.1*).

Adicionalmente, antes de enfrentar las células efectoras (ya marcadas con la sonda fluorescente) a las células diana, en ocasiones se incubaron previamente con reactivos o anticuerpos bloqueantes de interacciones entre ambos tipos de células. En la *Tabla 3.2* se recogen los reactivos utilizados y las condiciones empleadas.

**Tabla 3.2.** Relación de reactivos y anticuerpos bloqueantes utilizados sobre las eCTL y las eNK.

Reactivo	Tipo, especie	Concentración	Efecto	Proveedor
Anti-Integrina $\beta 2$	pc, cabra	10 $\mu\text{g/ml}$	Bloqueante de LFA-1	R&D Systems
EGTA	---	1 mM	Quelante de $\text{Ca}^{2+}$	Sigma
Fas-Fc	constructo, humanizado	10 ng/ml	Bloqueante de Fas-L	R&D Systems
Anti-MICA/B	mc, ratón	10 $\mu\text{g/ml}$	Bloqueante de MICA/B	R&D Systems
NKG2D-Fc	constructo, humanizado	6.25-25 $\mu\text{g/ml}$	Bloqueante de los receptores de NKG2D	R&D Systems
Pembrolizumab	mc, humanizado	10 $\mu\text{g/ml}$	Bloqueante de PD-1	R. Pazo
RIK2	mc, ratón	2.5 $\mu\text{g/ml}$	Bloqueante de TRAIL	BD
Anti-ULBP-1	mc, ratón	10 $\mu\text{g/ml}$	Bloqueante de ULBP-1	R&D Systems

### 3.1.4.3 Cultivos celulares con muestras de B-CLL

Las PBMC obtenidas de las muestras de B-CLL de pacientes se cultivaron a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI completo, suplementado con IL-4 recombinante humana (100 IU/ml, Peprotech). En caso de necesidad de preservar las muestras, y debido a su mayor sensibilidad en comparación con las líneas celulares tumorales, éstas se congelaron a una mayor densidad celular ( $30 \times 10^6$  células/vial).

## 3.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 3.2.1 Extracción y fraccionamiento de lisados celulares

Para cada línea celular se recogieron, al menos,  $3 \times 10^6$  células y se obtuvo el pellet de células por centrifugación durante 5 minutos a 450g. Seguidamente, éste se lavó una vez con PBS y se transfirió el contenido a un microtubo. Tras una nueva centrifugación, al pellet resultante se le añadió tampón de lisis ( $20 \mu\text{l}/10^6$  células aisladas) (ver *Tabla 3.3*) para la extracción de proteínas citoplasmáticas y se incubaron durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Después de esto, los lisados se centrifugaron 20 minutos a 11000g a  $4^\circ\text{C}$  y el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo.

**Tabla 3.3.** Composición de las disoluciones empleadas para obtener los lisados celulares.

Tampón	Composición	Concentración
Tampón de lisis	Triton-X-100	1% (v/v)
	NaCl	150 mM
	Tris-HCl	50 mM
	Glicerol	10% (v/v)
	EDTA	1 mM
	$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1 mM
	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	10 mM
	Leupeptina	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	NaF	10 mM
	PMSF	1 mM
	<i>pH</i>	7.6
Tampón de carga 3X	Tris-HCl	150 mM
	SDS	3% (v/v)
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.3 mM
	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	30 mM
	NaF	30 mM
	Glicerol	30% (v/v)
	2- $\beta$ -mercaptoetanol	30% (v/v)
	Azul de bromofenol	0.06% (p/v)
	<i>pH</i>	7.4

La concentración proteica en los lisados se determinó mediante la técnica de BCA (*Bicinchoninic acid assay*) utilizando un kit comercial (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se añadió la mitad del volumen aislado de lisados de tampón de carga 3X (ver *Tabla 3.3*). Finalmente, estos lisados celulares se calentaron a  $95^\circ\text{C}$  durante 5 minutos y se les aplicó un pulso de centrifuga para ser cargados en los geles de electroforesis o bien fueron conservados a  $-20^\circ\text{C}$  para su uso posterior.

### 3.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La separación de proteínas a partir de los lisados en función del peso molecular se realizó mediante electroforesis en gel de acrilamida/bis-acrilamida en 0.1% de SDS. Se llevó a cabo en geles verticales discontinuos, compuestos por dos tipos de geles de la misma composición, pero en distinta proporción: gel de stacking (gel superior, de alrededor de 2 cm de longitud) y gel

separador o “resolving gel” (gel inferior, de alrededor de 10 cm de longitud). La composición de los geles se recoge en la *Tabla 3.4*.

Los lisados celulares, una vez hervidos y centrifugados, se cargaron en los carriles correspondientes en el gel concentrador. También se aplicó una muestra de marcador de pesos moleculares (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo). Las electroforesis se realizaron en cubetas de Hoefer miniVE (GE Healthcare) en un tampón de carrera de electroforesis (Trizma 19 mM, Sigma; glicina 192 mM, Panreac; 0.01% SDS, Merck), en unas condiciones de 180 V y 20 mA/gel durante al menos 90 minutos, hasta que las muestras hubieran recorrido toda la longitud del gel.

**Tabla 3.4.** Composición de los geles utilizados para realizar electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS.

Compuesto	Stacking Gel	Resolving Gel 12%
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.65 ml	4 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.26 ml	-
Tris-HCl 0.5 M, pH 8.8	-	2.5 ml
SDS 10% (v/v)	50 µl	100 µl
Agua destilada	3 ml	3.35 ml
APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Volumen total	5.07 ml	10.06 ml

### 3.2.3 Transferencia de proteínas a membranas

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF) (Amersham Hybond™-P, GE Healthcare) previamente activada por incubación en metanol durante 2 minutos. La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca (BioRad) en unas condiciones de 20 V y 400 mA durante una hora, humedecidas en tampón de transferencia (Tris-HCl 48 mM, Sigma; glicina 39 mM, Sigma; 0.0373% SDS, Merck; 20% metanol grado HPLC, Panreac; pH 8.3).

### 3.2.4 Análisis de proteínas mediante inmunoblot (Western-Blotting) y detección de los inmunocomplejos.

Una vez transcurrida la transferencia, las membranas de PVDF con las proteínas fijadas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) disuelta en tampón B (timerosal 0.1 g/l; Tween 5 ml/l; disuelto en PBS) durante al menos 30 minutos. Seguidamente, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante varios lavados de 10 minutos con tampón B.

La incubación con el **anticuerpo primario** correspondiente (ver *Tabla 3.5*), se llevó a cabo diluyéndolo en una disolución de tampón B con un 5% (p/v) de BSA y 0.05% (p/v) de NaN<sub>3</sub>, a 4°C y en agitación durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se lavó al menos 3 veces la membrana con tampón B antes de incubarla con el **anticuerpo secundario**. Dicho anticuerpo (anti-IgG de conejo o de ratón conjugado con peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) se diluyó a una proporción de 1:20000 en tampón B con un 2% (p/v) de leche desnatada en polvo y se incubó la membrana con él durante una hora, a temperatura ambiente y en agitación. Por último, se eliminó esta última disolución y se procedió de nuevo a varios lavados con tampón B.

**Tabla 3.5.** Relación de anticuerpos empleados en los inmunoblots.

Nombre	Tipo, especie	Dilución	Proveedor
Complejo I (NDUFB6)	mc, ratón	1/5000	Molecular Probes
Complejo II (SDHA)	mc, ratón	1/5000	Molecular Probes
Complejo III (UQCRC2)	mc, ratón	1/5000	Mitosciences
Complejo IV (mt-CO1)	mc, ratón	1/5000	Mitosciences
Complejo V (ATP5b)	mc, ratón	1/5000	J.M. Cuezva
Bcl-2 (100/D5)	mc, ratón	1/250	Abcam
Bcl-x <sub>L</sub> (54H6)	mc, conejo	1/1000	Cell Signaling
ERK5	pc, conejo	1/1000	Cell Signaling
Mcl-1	pc, conejo	1/1000	Santa Cruz
β-actina	mc, ratón	1/10000	Sigma

La **detección** de la proteína de interés se realizó mediante la reacción de la enzima peroxidasa de rábano, conjugada al anticuerpo secundario, durante 2 minutos con un sustrato quimioluminiscente comercial (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific), o bien mediante la reacción de la enzima fosfatasa alcalina durante 5 minutos con su sustrato correspondiente (PhosphaGLO AP Substrate, KPL). Una vez transcurrido ese tiempo, la luz emitida en dicha reacción se detectó, tras envolver la membrana en film transparente de plástico, exponiendo dicha membrana sobre una película fotográfica (High performance chemiluminescence film, GE HealthCare) en oscuridad, dentro de una película fotográfica (Hypercassette™, Amersham Bioscience), durante un tiempo variable. Las películas se revelaron, tras la exposición, mediante inmersión en soluciones de revelador - agua destilada – fijador, en ese orden. La preparación de las soluciones de revelador (Sigma) y fijador (Kodak) se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. En función de su disponibilidad, para la detección de los inmunocomplejos, se utilizó de forma alternativa un aparato detector de luminiscencia (Amersham Imager 600), cedido amablemente por la Dra. Pilar Bayona. Este aparato evita el uso de películas fotográficas mediante la detección directa de luminiscencia tras la incubación con el sustrato correspondiente.

Se utilizó como control de carga inmunoblots anti- $\beta$ -actina (ver *Tabla 3.5*) siguiendo el mismo protocolo ya mencionado. La  $\beta$ -actina es una proteína estructural, abundante en todos los tipos celulares. Para el caso de la detección de los complejos respiratorios, se utilizó el C.II como control de carga (ver *Tabla 3.5*), dado que todas sus subunidades son de origen nuclear y por tanto su expresión no está condicionada por el estado de la mitocondria.

Por último, se utilizó la técnica de **densitometría** para analizar de forma cuantitativa las bandas obtenidas en los inmunoblots. Con esta finalidad se empleó el programa informático *ImageJ* (National Institutes of Health). Este software permite convertir las bandas de las proteínas reveladas en señales de intensidad cuantificables que pueden compararse de forma más precisa con el control de carga correspondiente.

### 3.2.5 Purificación de mitocondrias

Para la extracción y purificación de mitocondrias, se partió de 5 placas de 150 cm<sup>2</sup> de superficie al 80% de confluencia para células adherentes y de, al menos, 100 ml de células en suspensión en cultivo a una concentración cercana a 10<sup>6</sup> células/ml. Las células se recogieron en PBS suplementado al 10 % con SFB y se mantuvieron siempre a 4°C a partir de este momento. Tras centrifugar las células a 450g durante 10 minutos, el pellet celular fue lavado 2 veces con PBS. Seguidamente, el pellet de células se congeló a -80°C durante, como mínimo, 10 minutos para facilitar la ruptura celular.

Después, el pellet celular congelado se resuspendió en tampón hipotónico (ver *Tabla 3.6*), en una proporción aproximada de volúmenes tampón: pellet celular de 7:1. La suspensión de células se incubó durante 2 minutos en hielo y se transfirió a un homogeneizador Potter-Dounce con émbolo de teflón. Seguidamente, la mezcla se homogeneizó mediante 8-10 pases (600 rpm). Rápidamente, se le añadió 1 volumen de tampón hipertónico (ver *Tabla 3.6*) para equilibrar la concentración de sales y, tras mezclar bien, se centrifugó a 1000g durante 5 minutos a 4°C, para eliminar los núcleos y las células no lisadas durante el proceso.

Los sobrenadantes obtenidos se transfirieron a microtubos de 1.5 ml y se centrifugaron en una microcentrífuga a 11000g durante 2 minutos a 4°C. El pellet de mitocondrias obtenido se resuspendió en medio A (ver *Tabla 3.6*) y se procedió centrifugar de nuevo a 11000g durante 2 minutos, también a 4°C. Los pellets mitocondriales resultantes se resuspendieron en medio A, juntando dichos pellets en la mitad del volumen anterior. Este paso de lavado y centrifugación se repitió hasta tener todas las mitocondrias en un único microtubo.



**Tabla 3.6.** Composición de las disoluciones empleadas para la extracción de mitocondrias.

Tampón	Composición	Concentración
Tampón hipotónico	MOPS	10 mM
	Sacarosa	83 mM
	pH	7.2
Tampón hipertónico	MOPS	30 mM
	Sacarosa	250 mM
	pH	7.2
Medio A	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	Sacarosa	0.32 M
	pH	7.4
Tampón de resuspensión	Ácido aminocaproico	750 mM
	Bis-Tris	50 mM
	pH	7.0

El pellet de mitocondrias resultante se resuspendió en 500 µl de medio A, de los que se tomaron 3-5 µl para medir la concentración de proteínas de la muestra mediante el método Bradford (Bradford, 1976). Nuevamente, se volvió a centrifugar la muestra a 10000g durante 2 minutos y a 4°C, y se resuspendió finalmente en el volumen necesario de tampón de resuspensión (ver *Tabla 3.6*) para tenerlas a una concentración de 10 µg/µl.

### 3.2.5.1 Preparación de mitocondrias para análisis de complejos por electroforesis “Blue Native”

Para obtener las preparaciones mitocondriales para el análisis por *Blue-Native* (BN), las mitocondrias se lisaron utilizando digitonina a una concentración de 4 g/g de proteína mitocondrial. La digitonina permite que los complejos respiratorios se mantengan intactos y no se disgreguen las proteínas que los componen. Los lisados mitocondriales se incubaron a 4°C durante 5 minutos para favorecer su ruptura y se centrifugaron durante 30 minutos a 11000g y a 4°C. A continuación, se recogió el sobrenadante en varias alícuotas en microtubos, que se congelaron a -80°C hasta su utilización.

### 3.2.6 Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida BN

Los geles nativos en gradiente de poliacrilamida, descritos por primera vez por Schägger en 1991 (Schägger & von Jagow, 1991), permiten la resolución electroforética de complejos proteicos formados por más de una proteína. Esta metodología se puso a punto en 1996 para separar los complejos que integran la cadena de transporte electrónico (Schägger et al., 1996).

Para llevar a cabo este tipo de electroforesis, se utilizó un gel en gradiente del 3 al 12% comercial ya preparado (NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen). Tras montar el gel en el soporte adecuado, a 4°C, se añadieron los tampones comerciales del cátodo A (NativePAGE™ 20x

Cathode Buffer Additive, Invitrogen) y del ánodo (NativePAGE™ 20x Running Buffer, Novex, Life Technologies), diluidos en agua destilada, y se limpiaron los pocillos. Las mitocondrias permeabilizadas con digitonina, se mezclaron con 1/3 de su volumen de tampón de carga (Blue G 5%) y se cargaron en el gel. La electroforesis se ajustó a un voltaje de 100 V hasta que las muestras hubieron entrado completamente en el gel (aproximadamente 30 minutos). En ese momento, se limitó la corriente a 300 V y 15 mA, manteniéndose así hasta que dichas bandas alcanzaran el final del gel. Después de unos 30 minutos en dichas condiciones de electroforesis, se reemplazó el tampón del cátodo A por el B (ver *Tabla 3.7*), para poder apreciar mejor las bandas de las muestras a lo largo del recorrido electroforético.

**Tabla 3.7.** Composición de las disoluciones empleadas sobre los geles nativos de poliácridamida BN.

Tampón	Composición	Concentración
Tampón del cátodo B	Tricina	50 mM
	Bis-Tris	15 mM
	Serva blue G	0.002% (p/v)
	<i>pH</i>	7.0
Tampón de actividad del C.I en gel	Tris-HCl	0.1 M
	NADH	10 mM
	NBT	1 mg/ml
	<i>pH</i>	7.4
Tampón de actividad del C.IV en gel	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	Citocromo c	5 mM
	Diaminobencidina	0.05% (p/v)
	<i>pH</i>	7.2

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de PVDF y se analizaron las proteínas de interés por Western-Blot, tal y como se describe en los *Apartados 3.2.3 y 3.2.4*.

### 3.2.6.1 Determinación de la actividad del complejo I y IV en gel

Una vez terminada la electroforesis, se vertieron sobre el gel sendas disoluciones para observación de la actividad del C.I o del C.IV (ver *Tabla 3.7*). Esto se pudo visualizar por la aparición de un precipitado azul, en el caso del C.I, o marrón en el del C.IV, en la banda correspondiente. La reacción de detuvo al retirar las disoluciones del gel.

## 3.3 GENERACIÓN DE CÍBRIDOS TRANSMITOCONDRIALES

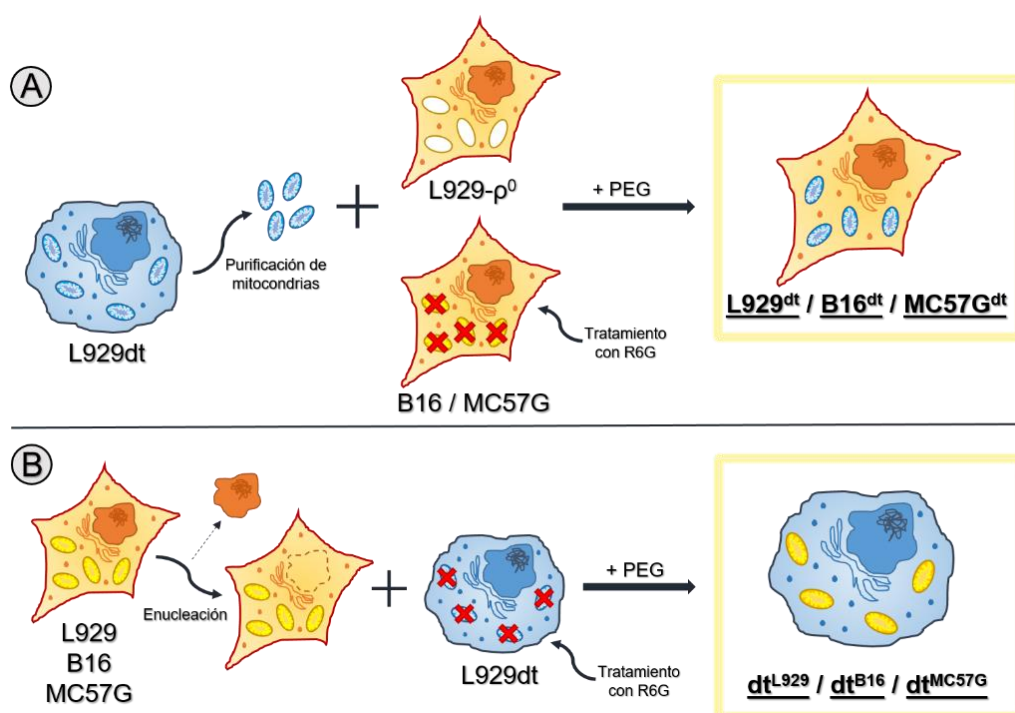
La transferencia de las mitocondrias de una línea celular a otro contexto nuclear supuso la generación de varias líneas celulares derivadas de sus parentales. Estos *cíbridos transmitocondriales* poseen, por tanto, el DNA nuclear de la línea celular receptora, y el mtDNA de la célula donadora de mitocondrias. Gracias a la valiosa colaboración con el grupo GENOXPHOS

de nuestro departamento, en esta Tesis se han generado varios cíbridos derivados de la línea L929dt, como se resume en la *Tabla 3.8*.

**Tabla 3.8.** Relación de líneas celulares transmitocondriales generadas.

Línea celular	Origen nuclear	Origen mitocondrial
dt <sup>L929</sup>	L929dt	L929
L929 <sup>dt</sup>	L929-p <sup>0</sup>	L929dt
dt <sup>B16</sup>	L929dt	B16
B16 <sup>dt</sup>	B16	L929dt
dt <sup>MC57G</sup>	L929dt	MC57G
MC57G <sup>dt</sup>	MC57G	L929dt

Dependiendo de si las células L929dt fueron las donadoras o receptoras de mitocondrias, se desarrollaron dos protocolos para la obtención de los cíbridos (ver *Figura 3.2*).



**Figura 3.2.** Esquema de la metodología empleada para la formación de cíbridos con origen mitocondrial (A) o nuclear (B) de las células L929dt.

### 3.3.1 Cíbridos de origen nuclear L929dt

Esta estrategia se utilizó para generar los cíbridos dt<sup>L929</sup>, dt<sup>B16</sup> y dt<sup>MC57G</sup>. Se emplearon distintos tratamientos a las células parentales previos a la fusión:

- **L929dt.** Para la *eliminación de las mitocondrias*, estas células se trataron con rodamina-6-G (R6G) a 2.5 µg/ml. La R6G es un compuesto que se une irreversiblemente a la membrana mitocondrial, destruyendo las mitocondrias. Tras el tratamiento con R6G, las células son incapaces de sobrevivir, a menos que sean repobladas con mitocondrias. Durante el tratamiento, la supervivencia de las células se mantiene suplementando el

medio con uridina (Medio  $p^0$ , ver *Apartado 3.1.2*). Estas células se trataron durante una semana, previa a la fusión, con R6G en Medio  $p_0$ , renovando el medio cada 24 horas. Dos horas antes de la fusión, se eliminó la R6G del cultivo.

- **L929, B16 y MC57G.** Estas células se sembraron el día previo a la fusión en placas de 12.5 cm<sup>2</sup> para que estuvieran completamente adheridas a ella y en confluencia. Después de esto, se llevó a cabo el proceso de **enucleación** de las mismas. Para ello, se trataron durante una hora con el inhibidor de microtúbulos citocalasina B (20  $\mu$ M en DMEM completo, Sigma). Seguidamente, las placas se centrifugaron a 8700g, durante 20 minutos a 30°C. Al no estar sujetos a las células por la acción de la citocalasina B y debido a su tamaño y densidad, los núcleos fueron expulsados por exocitosis durante la centrifugación, manteniéndose el resto de la célula adherido a la placa, incluyendo las mitocondrias. Finalmente, se tripsinizaron los mitoplastos obtenidos.

Para el proceso de **fusión**, se centrifugaron ambas partes a 340g durante 5 minutos, se resuspendieron las L929dt tratadas en 2 ml de medio y se añadieron sobre el pellet de mitoplastos sin resuspender. Se llevó a cabo otra centrifugación en las mismas condiciones para que se mezclaran y obtener el pellet final. Tras remover el medio, se fusionaron en 100  $\mu$ l de polietilenglicol al 50% (v/v), resuspendiendo suavemente durante un minuto. Pasado este tiempo, se diluyó en 2 ml de DMEM- $p^0$  (en lugar de DMEM completo, para evitar mayor estrés celular) y se sembró en una placa de 6 pocillos.

Al día siguiente, se cambió el medio de cultivo de DMEM- $p^0$  a DMEM completo para comenzar la **selección** de los híbridos: aquellas células que hayan incorporado las mitocondrias introducidas en la fusión serán capaces de sobrevivir en medio DMEM completo, mientras que en aquellas que no se hayan incorporado no podrán. Como controles de la fusión, se sembraron por separado otros pocillos las células enucleadas y las células L929dt tratadas con R6G en medio DMEM completo para comprobar el no crecimiento de las mismas.

La **verificación** de la introducción de mitocondrias de otro origen en células de origen nuclear L929dt se realizó mediante RFLP y observación de los fragmentos obtenidos por gel de poliacrilamida al 10% (ver *Apartado 3.4.5*).

### 3.3.2 Cíbridos de origen mitocondrial L929dt

Esta estrategia se empleó para la obtención de los cíbridos L929<sup>dt</sup>, B16<sup>dt</sup> y MC57G<sup>dt</sup>. Al igual que en los casos anteriores, también se emplearon tratamientos distintos previos a la fusión:

- **B16 y MC57G.** Las células donadoras del genoma nuclear se trataron con **R6G** del mismo modo que el descrito en el *Apartado 3.3.1*. Para el caso de las **L929-p<sup>0</sup>**, este tratamiento no fue necesario, dado que no poseen genoma mitocondrial.
- **L929dt.** Dado que las células L929dt crecen en suspensión, a diferencia de las líneas celulares L929, B16 y MC57G, no es posible obtener los mitoplastos de ellas a partir del proceso de enucleación. Por tanto, para este caso, se utilizaron **mitocondrias frescas**, aisladas empleando el protocolo ya descrito en el *Apartado 3.2.5*, en las mayores condiciones de esterilidad posibles. Para evitar el crecimiento de células L929dt que puedan quedar tras el proceso de aislamiento de mitocondrias, se incubaron previamente a la purificación durante 2 horas con mitomicina C (25 µg/ml).

El proceso de **fusión** se llevó a cabo de manera similar al de los cíbridos de origen nuclear L929dt, centrifugando la suspensión de células tratadas con R6G sobre el pellet mitocondrial de las células L929dt, resuspendiendo un minuto en polietilenglicol, diluyendo en de DMEM-p<sup>0</sup> antes de sembrar en una placa de 6 pocillos.

De la misma forma que en el Apartado anterior, se cambió al día siguiente el medio a DMEM completo para comenzar con la **selección** de los cíbridos. Asimismo, se comprobó que tanto las células donadoras de núcleo como las mitocondrias aisladas de las células L929dt eran incapaces de crecer en DMEM completo.

La **verificación** de la introducción de mitocondrias de origen L929dt también se llevó a cabo por RFLP y observación de los fragmentos obtenidos por gel de poliacrilamida al 10% (ver *Apartado 3.4.5*).

## 3.4 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 3.4.1 Extracción de DNA de células en cultivo

Para el aislamiento de DNA a partir de líneas celulares en cultivo, se recogieron 3x10<sup>6</sup> células y se centrifugaron a 340g durante 5 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 260 µl de medio de digestión (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, proteinasa K 76 µg/ml, ribonucleasa A 96 µg/ml, SDS al 0.5% (v/v), pH 7.5) para solubilizar las membranas, digerir las proteínas y eliminar el RNA, dejándose incubar hasta el día siguiente a 37°C.

Después de esto, se realizó una doble extracción del DNA, con el objetivo de obtener una preparación de DNA más pura para los ensayos de RT-PCR (ver *Apartado 3.4.7*). Primeramente, se añadieron 1.5 volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) saturado con una disolución de Tris-HCl 10mM y EDTA 1 mM y pH 8 comercial (P2069, Sigma). La mezcla se centrifugó 5 minutos a 10000g y se recogió la fase acuosa. Seguidamente, se realizó la segunda extracción con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se procedió a precipitar el DNA mediante la adición de 50 µl de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol a 4°C. La disolución se mezcló por inversión y se congeló durante al menos 3 horas a -20°C. Tras esto, se centrifugó el DNA a 10000g durante 30 minutos a 4°C. Por último, se eliminó el etanol, se secó el pellet de DNA y se resuspendió en un tampón de Tris-HCl (10 mM, pH 8).

La cuantificación y la pureza de los extractos de DNA aislados se evaluaron por medición de la absorbancia de las muestras a 260 y a 280 nm en un espectrofotómetro (NanoVue, GE Healthcare).

### 3.4.2 Reacción de PCR

La amplificación de fragmentos del DNA genómico obtenido se llevó a cabo mediante PCR. Para ello, se añadieron 500 ng de DNA a una mezcla de reacción de 50 µl de volumen total (ver *Tabla 3.9*).

**Tabla 3.9.** Composición de la mezcla de reacción para PCR.

Componentes	Volumen (µl)	Concentración
Tampón de reacción	5	1x
dNTP's	1	0.2 M (cada uno)
Cebador Forward	2	0.4 µM
Cebador Reverse	2	0.4 µM
IBIAN Taq	0.3	1.5 U
DNA	---	500 ng
Agua destilada	Hasta 50 µl	---

Para todos los casos, el programa de PCR utilizado fue:

1. Desnaturalización previa: 2' 95°C
2. Desnaturalización: 30'' 95°C
3. Hibridación: 30'' Tm para cada pareja de cebadores
4. Extensión: 1–2' 72°C
5. Final de la reacción: 5' 72°C

La temperatura de hibridación (Tm) depende del par de cebadores utilizados y el tiempo de extensión del tamaño del fragmento de DNA a amplificar, normalmente 1 minuto / 1000 bases. Para calcular la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se empleó la siguiente fórmula:

$$Tm = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (G + C)$$

Los pasos 2, 3 y 4 se repitieron durante 25–30 ciclos para la amplificación del DNA. Cuando fue necesario, la amplificación del DNA se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v, ver el siguiente apartado).

### 3.4.3 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Para comprobar la amplificación de un fragmento de DNA por PCR, o para observar la digestión del mismo por una enzima de restricción, se emplearon geles de agarosa al 1 o 2% (p/v). Éstos se prepararon fundiendo 0.3 o 0.6 g (para el 1 o 2%, respectivamente) de agarosa (Scharlau) en 30 ml de tampón TAE 1x (UltraPure™ TAE Buffer, Gibco) y añadiendo SYBR Safe (1:10000, SYBR® Safe DNA gel stain, Invitrogen) para teñir el DNA. Esta mezcla se vertió en caliente sobre los moldes para su gelificación. Cada muestra de DNA se mezcló con tampón de carga (10X Loading Buffer, Clontech). Como estimación del peso de los fragmentos, se añadió en uno de los carriles del gel un marcador de peso molecular (1KB DNA Marker, Biomiga). La electroforesis se realizó a 90 V y 400 mA durante 30-60 minutos. La visualización de los geles se analizó en un transiluminador (GeDoc 2000, Biorad), empleando el software informático Quantity One v.4.6.5.

### 3.4.4 Secuenciación del mtDNA

La secuenciación de las muestras de DNA se realizó en la Unidad de Genómica del Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. La cantidad total de DNA necesaria por cada reacción de secuenciación dependía del tipo de DNA que se enviase a secuenciar. En la *Tabla 3.10* se recogen las cantidades necesarias de DNA y oligonucleótido, así como la concentración óptima de cada uno de ellos, para una única reacción de secuenciación, en función del tipo de DNA a secuenciar.

**Tabla 3.10.** Concentraciones óptimas de productos de PCR y plásmidos sugeridas por el servicio de secuenciación.

<i>Tamaño de la secuencia</i>	<b>Productos de PCR</b>	
	<i>100-2000 pb</i>	<i>&gt; 2000 pb</i>
<b>Cantidad total de DNA</b>	5	1x
<b>Cantidad total de oligonucleótido</b>	1	0.2 M (cada uno)
<b>Concentración óptima de DNA</b>	2	0.4 μM

Con el objeto de obtener la cantidad adecuada de DNA para la secuenciación, los fragmentos de DNA de interés se amplificaron por PCR tal como se indica en el apartado anterior, empleando los cebadores que se muestran en la *Tabla 3.11*.

**Tabla 3.11.** Relación de cebadores empleados para la amplificación del DNA de interés para secuenciar.

Fragmento	Nombre del cebador	Posición (NC_005089)	Secuencia	Tamaño
1	1F	1918-1939	ACAAGAACCCCGCCTGTTTACC	1607
	1R	3504-3525	AGTTAGTTGAGTAGAGTTCTGG	
2	2F	3269-3291	ATTACTTCTGCCAGCCTGACCCA	1522
	2R	4802-4821	GTTAGTGAAGTGAATAAAT	
3	3F	3862-3883	AAGCTATCGGGCCCATACCCCG	1343
	3R	5184-5205	CTCTACTAAGACTTCTACCGCC	
4	4F	9072-9093	CGAAACCACATAAATCAAGCCC	1973
	4R	11024-11045	GTGGCTAACTGAGGAGTAGGCG	
5	5F	10803-10824	CACCTATGACTACCAAAAGCCC	1361
	5R	12186-12164	TTCCACCCCTTCTCAGCCAATG	
6	6F	11703-11724	TAGGAACCAAAACCTTGGTGC	1221
	6R	12903-12924	TTAGGTCTTTGAGTAGAACCC	
7	7F	12385-12406	GCCTATTAATCGCAGCTACAGG	1844
	7R	14208-14229	ATGAAATGTTGGATGGGGCAGG	

Una vez obtenidos los fragmentos de interés amplificados, las muestras se purificaron utilizando el kit de GenElute™ PCR Clean-up (Sigma) antes de enviarse al servicio de secuenciación. Como cebadores de las reacciones de secuenciación se utilizaron oligonucleótidos para fragmentos de PCR diseñados y cedidos amablemente por la Dra. Raquel Moreno (ver *Tabla 3.12*). Finalmente, los resultados de la secuenciación se analizaron en un ordenador usando los programas informáticos BioEdit 5.0.9 o Chromas 1.43.

**Tabla 3.12.** Relación de cebadores empleados para la secuenciación de los fragmentos de DNA obtenidos.

Fragmento	Nombre del cebador <i>forward</i>	Posición	Secuencia	Tª de fusión
1	1A	2572-2593	GGACAAGAGAAATAGAGCCACC	64°C
	1B	3010-3031	TTCCCCTACCAATACCACACCC	68°C
2	2A	3269-3290	ATTACTTCTGCCAGCCTGACCC	68°C
3	3A	3862-3883	AAGCTATCGGGCCCATACCCCG	72°C
	3B	4448-4469	ATAGCCTATTCATCAATTGCC	62°C
4	4A	9301-9322	ACTTCGGATTTGAAGCCGCAGC	68°C
	4B	9745-9766	CAATTCTATCTCTAGGCCTAGC	64°C
	4C	10326-10347	AATATATTCTCCTCAGACCCCC	64°C
5	5A	10803-10824	CACCTATGACTACCAAAAGCCC	66°C
	5B	11460-11481	CGAGAACTAACAATAAGCCC	64°C
6	6A	12000-12021	ATCCTGTTTACATCTGTAGCCC	64°C
	6B	12255-12276	ATCCTCTATAACCGCATCGGAG	66°C
7	7A	12852-12873	TCATGCCTAGTAATCGGAAGCC	72°C
	7B	13423-13444	CCATCCCAAAATCCACCTCAAC	66°C



### 3.4.5 Análisis de mutaciones y polimorfismos en el mtDNA por RFLP

Para comprobar la presencia de las mutaciones y polimorfismos encontrados por secuenciación en el mtDNA de las células L929dt en comparación con las células parentales L929, se procedió a la amplificación por PCR del fragmento que la contenía y a la posterior digestión con enzimas de restricción.

Por una parte, para confirmar la presencia de la mutación **C4859T** en el gen *mt-Nd2* en células L929dt se amplificó un fragmento de PCR de 737 pares de bases utilizando los siguientes oligonucleótidos:

ND2L1: 5' ATAGCCTATTCATCAATTGCCC 3' (4448-4470)

ND2H: 5' CTCTACTAAGACTTCTACCGCC 3' (5184-5205)

La versión mutante, 4859T, elimina un sitio de reconocimiento para la enzima *HphI*. Cuando la mutación no está presente, la reacción de digestión tiene como productos dos fragmentos de 403 y 334 pares de bases.

Por otra parte, para confirmar la presencia de la mutación **C4206T** en el gen *mt-Nd2* en células L929dt se amplificó un fragmento de PCR de 424 pares de bases utilizando los siguientes cebadores.

ND2L: 5' AAGCTATCGGGCCCATACCCCG 3' (3862-3884)

ND2Hb: 5' TAATCAGAAGTGGAATGGGGCG 3' (4236-4258)

En este caso, la versión mutante, 4206T, genera dos sitios de reconocimiento para la enzima *SspI* que producen la aparición de tres bandas de 306, 52 y 39 pares de bases. Cuando la mutación no está presente, se elimina el sitio de restricción entre las bandas de 52 y 39 provocando la aparición de una nueva banda de 91 pares de bases.

En ambas situaciones, la reacción se llevó a cabo durante 2-3 horas a 37°C en un volumen final de 25 µl. La mezcla de digestión contenía 5 µl de producto de PCR, 2.5 µl de tampón de digestión 10x, 1 µl de enzima (*HphI* para la mutación C4859T y *SspI* para C4206T, ambas a una concentración de 10 U/µl) y 16.5 µl de agua estéril. Transcurrida la digestión, los fragmentos se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % (p/v) en el caso de la digestión con *HphI*, y en un gel de poliacrilamida al 10% (p/v) para la digestión con *SspI*.

La técnica de RFLP y observación de los fragmentos de DNA en gel de poliacrilamida también se empleó como **método de verificación de la fusión transmitocondrial** durante la formación de híbridos (ver *Apartado 3.3*). Las mitocondrias de la línea celular L929dt, a diferencia de las provenientes de las células L929, B16 y MC57G, poseen la mutación C4206T. Esto permitió la diferenciación de aquellas líneas celulares transmitocondriales con mitocondrias de uno u otro

origen por la aparición o no de fragmentos de 39 y 52 o de 91 pares de bases tras la digestión con la enzima de restricción Sspl y la electroforesis en gel de poliacrilamida.

### 3.4.6 Aislamiento de RNA y obtención de cDNA monocatenario

Para la obtención de RNA se partieron de un mínimo de  $5 \times 10^6$  células en cultivo. El aislamiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (TRIzol® Reagent, Life Technologies), empleando los materiales adicionales indicados en el protocolo. La cuantificación del RNA purificado se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (NanoVue, GE Healthcare).

El cDNA se obtuvo utilizando como molde RNA total de células en cultivo, empleando un kit comercial (1st Strand cDNA Síntesis Kit for RT-PCR (AMV), Roche). Para la preparación de las muestras de RNA, se desnaturalizaron a 65°C durante 15 minutos, y se dejaron posteriormente a 4°C otros 5 minutos. Posteriormente, se mezclaron en el tubo de reacción con los siguientes reactivos:

**Tabla 3.13.** Reactivos necesarios para sintetizar cDNA a partir de RNA total.

	Concentración inicial	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón de reacción	10x	2.0	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4.0	5 mM
dNTPs	10 mM cada uno	2.0	1 mM cada uno
Oligo-p(dT) <sub>15</sub>	0.8 μg/μl	2.0	80 ng/μl
Inhibidor de RNAsas	50 U/μl	1.0	50 U (2.5 U/μl)
Transcriptasa reversa (AMV)	1 U/μl	0.8	0.8 U (0.04 U/μl)
RNA total	± 1 μg/μl	1.0	1 μg (0.05 μg/μl)
Agua (hasta 20 μl)	---	7.2	---

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, donde se incubó a 25°C durante 10 minutos, y después a 42°C durante una hora. Una vez terminado el proceso, la transcriptasa reversa se desnaturalizó incubando la mezcla de reacción a 99°C durante 5 minutos y enfriando a 4°C durante 5 minutos. Finalmente, el cDNA obtenido así se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 3.4.7 Cuantificación del número de copias de mtDNA o transcritos mediante “Real Time” PCR (RT-PCR)

La evaluación del número de copias del mtDNA o la cuantificación de genes se llevó a cabo mediante RT-PCR, empleando un sistema capilar. Para ello, se utilizó un kit comercial (LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I, Roche). En este caso, se mezclaron en un capilar: 4 μl de Master Mix, 0.5 μl de Primer Mix (5 μM cada uno), 3 μl de la muestra de DNA o cDNA molde y 12.5 μl de H<sub>2</sub>O.

El programa de amplificación consta de las fases que se detallan a continuación y los cálculos se hicieron de la misma forma que en el *Apartado 3.4.2*:

1. Desnaturalización: 10' 95°C  
[1 Ciclo]
2. Cuantificación: 10'' 95°C  
[55 Ciclos] 10'' 60°C (\*)  
10'' 72°C
3. Fusión: 0'' 95°C  
[1 Ciclo] 15'' 65°C  
0'' 98°C
4. Enfriamiento: 30'' 40°C  
[1 Ciclo]

(\*) Esta temperatura depende de los primers utilizados.

### 3.4.7.1 Cuantificación del número de copias de mtDNA

Para cuantificar el número de copias de mtDNA de una línea celular, se emplearon cebadores diseñados y cedidos amablemente por la Dra. Raquel Moreno (ver *Tabla 3.14*). Como gen mitocondrial, se escogió la subunidad Co2 del C.IV. Como control de carga para normalizar el resultado, se empleó un gen nuclear (SDHA, subunidad del C.II). El DNA se extrajo como se detalla en el *Apartado 3.4.1* y se escogió una concentración de trabajo de 4 ng/μl.

**Tabla 3.14.** Cebadores utilizados para cuantificar el número de copias de mtDNA por RT-PCR.

Gen	Cebador	Posición	Secuencia
<b>mt-Co2 ratón (NC_005089)</b>	COII RTF	7037-7052	CTACAAGACGCCACAT
	COII RTR	7253-7238	GAGAGGGGAGAGCAAT
<b>SdhA ratón (AK049441)</b>	SDH RTF	1026-1043	TACTACAGCCCCAAGTCT
	SDH RTR	1219-1202	TGGACCCATCTTCTATGC

### 3.4.7.2 Cuantificación del número de copias de un transcrito

Para cuantificar el nivel de expresión de los genes de interés, se utilizó como molde para la RT-PCR una dilución 1/100 de un cDNA sintetizado como se indica en el *Apartado 3.4.6* y los protocolos de reacción fueron los mismos que en el caso del DNA.

Los cebadores de los genes mitocondriales y de los genes nucleares empleados se recogen en la *Tabla 3.15*.

**Tabla 3.15.** Cebadores utilizados para cuantificar el nivel de expresión de diversos genes de ratón por RT-PCR.

Gen	Cebador	Posición	Secuencia
<b>Atpif1 ratón</b> (NM_007512)	Atpif1 RTF	68-88	GAGGCTTCGTCTCGGACTCG
	Atpif1 RTR	118-138	GCTCCACCAGCTTCTCGGAT
<b>Sod2 ratón</b> (NM_013671)	mSOD2 RTF	394-412	AACGCCACCGAGGAGAAGT
	mSOD2 RTR	436-460	GAAGAGCGACCTGAGTTGTAACATC
<b>Cat ratón</b> (NM_009804)	m-Cat RTF	650-669	CGTCCCGAGTCTCTCCATCA
	m-Cat RTR	705-723	TTCATGTGCCGGTGACCAT
<b>Actb ratón</b> (NM_007393)	Actina RTF	658-675	TGACCGAGCGTGGCTACA
	Actina RTR	702-723	TCTCTTTGATGTCACGCACGAT

El número de copias de un transcrito se calculó de forma relativa al número de copias de otro, en este caso  $\beta$ -actina (*Actb*) mediante la fórmula:

$$N^{\circ} \text{ copias} \frac{Gen X}{Gen Y} = 2^{\Delta Ct}$$

Donde:

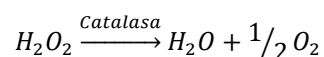
- $\Delta Ct = Ct_Y - Ct_X$
- Ct: número de ciclos necesarios para traspasar el umbral.
- Gen X: gen de interés
- Gen Y: gen de referencia (*Actb*)

### 3.5 MEDIDAS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES

Las actividades enzimáticas de la catalasa y de la SOD se evaluaron en extractos proteicos, obtenidos como se indica en el *Apartado 3.2.1*. Estas determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible *UV 500* (Unicam) y los datos se registraron utilizando el software *Vision 32*.

#### 3.5.1 Medida de la actividad de la catalasa

La determinación de la actividad de la catalasa se evaluó cinéticamente por medición de la disminución en la absorbancia a una longitud de onda de 240 nm. La catalasa cataliza la reacción:



El  $H_2O_2$  absorbe a 240 nm, pero no los productos de la reacción. Con lo cual, el avance de la reacción implica la disminución de la absorbancia a esta longitud de onda.

Para la medición, se mezclaron 300-600  $\mu$ g de los extractos proteicos con  $H_2O_2$  (20 mM) y agua hasta un volumen final de 0.9 ml y se midió la variación lineal de la absorbancia ( $\Delta$ Abs)

durante 5 minutos. Se empleó como blanco muestras sin añadir  $H_2O_2$ . La actividad se calculó como:

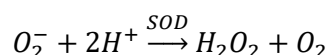
$$\frac{U}{mg} = \frac{\frac{\Delta Abs_{240}}{min} \cdot 1000}{43.6 \cdot \frac{mg \text{ proteínas}}{ml \text{ reacción}}}$$

Donde:

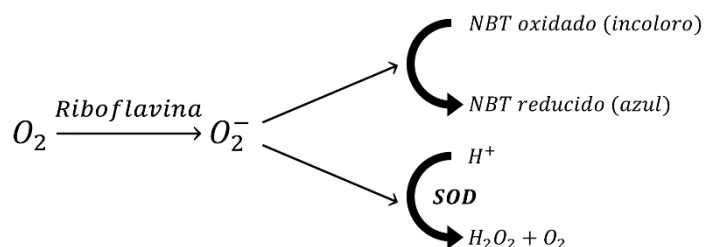
- $\Delta Abs_{240}/min$ : la variación de la absorbancia en 30 segundos multiplicada por dos.
- U: se define como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1  $\mu mol$  de  $H_2O_2$ /minuto.

### 3.5.2 Medida de la actividad de la SOD

La determinación de la actividad de la SOD se llevó a cabo por el bloqueo de la reducción del nitro-azul de tetrazolio (NBT, *Nitro Blue Tetrazolium*) a una longitud de onda de 560 nm. La SOD cataliza la reacción:



La riboflavina, excitada por la luz ultravioleta, oxida al TEMED (donador de electrones) y reduce el  $O_2$  del aire a  $O_2^-$ . Estos iones a su vez reducen al NBT, que pasa de la forma oxidada (incolores) a la reducida (azul, con absorbancia a 560 nm).



Para evaluar la acción catalítica de la SOD, se prepararon en cubetas distintas las disoluciones con los reactivos necesarios (ver *Tabla 3.16.A*) y se procedió a hacer el blanco y a realizar una primera medición de todas las muestras.

**Tabla 3.16.** Contenido de las cubetas para la medición de la actividad de la SOD.

<i>A) Mezcla de reactivos añadidos a las cubetas antes de la reacción</i>				
<i>Cubeta</i>	<b>Extracto proteico</b>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (67 mM, pH 7.8)</b>	<b>EDTA (100 mM)</b>	<b>NBT (1.2 mM)</b>
<b>Blanco</b>	-	900 µl	65 µl	35 µl
<b>Control negativo</b>	-	900 µl	65 µl	35 µl
<b>Muestra</b>	600 µg	Completar a 1 ml	65 µl	35 µl

<i>B) Mezcla de reactivos añadidos a las cubetas A para iniciar la reacción</i>				
<i>Cubeta</i>	<b>Mezcla A</b>	<b>Riboflavina (0.12 mM)</b>	<b>TEMED (23.5 mM)</b>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (67 mM, pH 7.8)</b>
<b>Blanco</b>	1 ml	-	-	23.6
<b>Control negativo</b>	1 ml	20 µl	3.6 µl	-
<b>Muestra</b>	1 ml	20 µl	3.6 µl	-

Seguidamente, se añadieron sobre las cubetas los volúmenes de reactivos necesarios para comenzar la reacción (ver *Tabla 3.16.B*) y se incubaron durante 10 minutos en un irradiador de luz ultravioleta (TransUV). Pasado este tiempo, se midió de nuevo la absorbancia a 560 nm frente al blanco.

El porcentaje de inhibición de la SOD se calculó como:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\left(\frac{\Delta Abs_{560}}{\text{min}}\right)_{\text{control negativo}} - \left(\frac{\Delta Abs_{560}}{\text{min}}\right)_{\text{muestra}}}{\left(\frac{\Delta Abs_{560}}{\text{min}}\right)_{\text{control negativo}}} \cdot 100$$

Donde la  $\Delta Abs_{560}/\text{min}$  es la variación de la absorbancia antes y después de la reacción, dividida entre 10 minutos. Para el caso del control negativo, esta variación será máxima, dado que al no haber muestra no habrá SOD.

Finalmente, la actividad enzimática se obtuvo como:

$$\frac{U}{mg} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50 \cdot mg \text{ proteína}}$$

## 3.6 MEDICIÓN DE LA RESPIRACIÓN CELULAR

### 3.6.1 Electrodo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió en un electrodo tipo Clark termostatzado (Oxytherm, Hansatech Instruments) compuesto por un cátodo de platino y un ánodo de Ag-AgCl, inmersos en una solución de KCl saturado al 50% y separados por una membrana de teflón permeable al oxígeno. La pieza que incluye la cámara de reacción se colocó sobre la cubeta que contenía los electrodos. Además de esto, la pieza se envolvió en otra cámara termostatzada que mantuvo las condiciones de las mediciones a 37°C. La cámara se cerró con un émbolo provisto de una abertura

capilar en su centro para permitir la salida de aire y la adición de los reactivos durante el experimento. El contenido de la cámara de reacción se mantuvo con agitación magnética de manera constante. Los datos obtenidos en cada experimento se registraron en un ordenador a través del software Oxygraph Plus V1.00 (Hansatech Instruments).

Antes de comenzar a realizar las mediciones con el electrodo, se fijó la temperatura del mismo a 37°C y se calibró el aparato estableciendo el cero mediante adición de un agente oxidante como el ditionito de sodio. La adición de sustratos se realizó usando jeringas Hamilton de 10 o 25 µl. Después de cada medida, la cámara de reacción se lavó con agua y con albúmina sérica bovina, (BSA) al 10%, para eliminar los restos de inhibidores.

### **3.6.2 Medida de respiración endógena y desacoplada en células intactas**

La respiración endógena consiste en la capacidad de las células de producir oxígeno en estado basal. Cuando se desacopla el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP, se obtiene la tasa de respiración máxima. Esto se consigue mediante la adición de un desacoplante, que rompe el gradiente electroquímico de la membrana interna mitocondrial y las células se ven forzadas en contrapartida a bombear el mayor número de H<sup>+</sup> posibles para tratar de restablecer el gradiente.

#### **Preparación de reactivos:**

El dinitrofenol (DNP) usado como desacoplante se preparó a una concentración de 6.5 mM. Para preparar 10 ml, se pesaron 12 mg de DNP y se disolvieron en 4 ml de NaOH 1M. La mezcla se calentó durante 20 minutos a 50°C y se ajustó su pH a 7.0. El volumen final se ajustó a 10 ml con H<sub>2</sub>O, se alicuotó y se congeló a -20°C. El KCN usado como inhibidor se preparó a una concentración de 400 mM en agua destilada.

#### **Procedimiento experimental:**

Para las medidas de respiración endógena, se utilizaron 5x10<sup>6</sup> células para cada medida. Las células, una vez recogidas y centrifugadas, se resuspendieron en 1 ml de DMEM completo y se introdujeron en la cámara del electrodo para registrar su tasa de respiración endógena, es decir, cuando la respiración está acoplada a la síntesis de ATP. Transcurridos 2-3 minutos, se añadieron 10 µl de la disolución de DNP preparada, para desacoplar la cadena respiratoria y detectar la máxima capacidad OXPHOS de las células. Transcurridos otros 2-3 minutos, se

añadieron 10 µl de KCN 400 mM para inhibir el consumo de oxígeno asociado a la cadena de transporte electrónico.

Como resultado de esto, se obtuvieron a través del software rectas del consumo de oxígeno frente al tiempo. La capacidad respiratoria de las células se calculó como:

$$\text{Capacidad respiratoria} = \frac{\text{Fentomol } O_2}{\text{minuto} \cdot \text{célula}}$$

### 3.7 MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

De manera rutinaria, el crecimiento de las líneas celulares en cultivo se evaluó mediante tinción con el colorante azul Trypan y conteo en una cámara de Neubauer a través de un microscopio óptico (ver *Apartado 3.1.3.1*). No obstante, para la determinación del efecto de fármacos sobre las células, se utilizó el método de Mosmann modificado (Alley et al., 1988).

El **método de Mosmann** modificado relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul de formazán insolubles en medio acuoso, producidos por oxidación del MTT (bromuro de dimetil-tiazoliltetrazolio, Sigma). Los resultados de este método, a través de la comparativa de cristales formados, proporcionan información de la alteración en la proliferación celular inducida por un fármaco o agente que produce inhibición del crecimiento y/o la muerte celular.

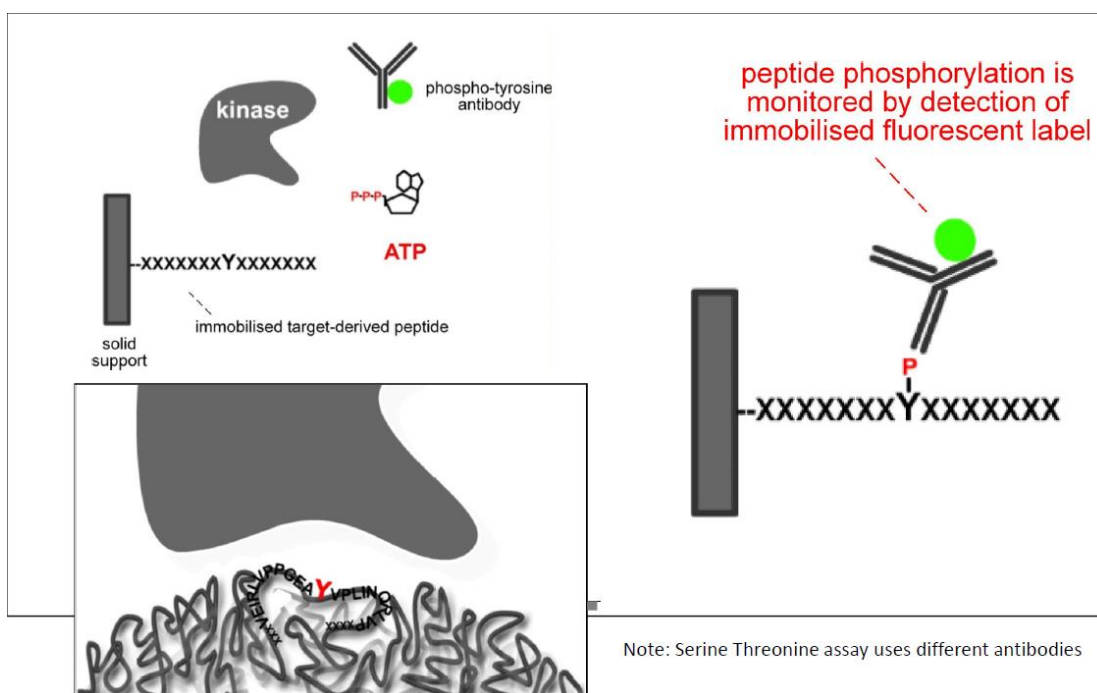
Las células se cultivaron a una concentración variable ( $10^4$  células/pocillo para células adherentes y  $3 \times 10^4$  para células en suspensión) en placas de 96 pocillos de fondo plano y se dejaron crecer en presencia del fármaco correspondiente el tiempo requerido para cada experimento. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se añadió a cada pocillo 10 µl de una disolución de MTT (5 mg/ml, preparada en PBS) con una pipeta de repetición. Las placas se incubaron 2-3 horas a 37°C y se centrifugaron 10 minutos, a 1000g y se eliminó el sobrenadante de los pocillos por inversión rápida. Los cristales de formazán formados se disolvieron añadiendo a cada pocillo 70 µl de una mezcla de isopropanol-HCl (50 mM) y dejando remover en una placa agitadora (Bioblock). Se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas ELISA (MR5000, Dynatech). Como blanco se empleó medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares. Los resultados se presentaron como el porcentaje de crecimiento de las células expuestas a las distintas concentraciones del fármaco respecto al control de células no tratadas.



### 3.8 ANÁLISIS DEL QUINOMA

Las líneas celulares L929 y L929dt se escogieron para analizar de forma comparada la actividad tanto de las proteín tirosín quinasas (PTK) como de las serín treonín quinasas (STK). Con este objetivo, se contrató el servicio de la empresa PamGene International B.V. (Hertogenbosch, Países Bajos), que poseen la tecnología adecuada para realizar este ensayo.

Se trataron a ambas células con un kit de reactivos para lisarlas, siguiendo las indicaciones del fabricante (M-PERR® Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo). La separación de los restos celulares y la cuantificación proteica se realizó tal como se indica en el *Apartado 3.2.1*. Se comprobó que todos los extractos alcanzaron una concentración mínima de 1 µg/µl y se conservaron a -80°C hasta el momento de su envío. Las muestras, empaquetadas en hielo seco, se mandaron finalmente a la estación PamGene, donde se realizó el ensayo.



**Figura 3.3.** Esquema del ensayo realizado para la detección de la actividad de las PTK (PamGene).

Estas determinaciones consistieron en la exposición de los lisados celulares sobre *arrays* de péptidos que contenían los sitios de fosforilación de las quinasas celulares, mimetizando de esta manera a sus sustratos. Para ello, se mezclan 5 µg (para las PTK) o 0.5 µg (para las STK) con ATP (400 µM), como donador de grupos fosfato, y se introducen en los arrays para que fosforilen a estos péptidos en función de su cantidad y/o actividad. Tras ello, los arrays se incuban con el anticuerpo correspondiente que reconoce estos sitios de fosforilación (uno para cada tipo de quinasa), conjugado con una sonda fluorescente (ver *Figura 3.3*). Seguidamente, se mide la intensidad de fluorescencia para cada uno de los péptidos del array y se comparan entre las dos

líneas celulares ensayadas. Los datos de la intensidad relativa observada para cada sustrato proteico fosforilado se representó como la variación normalizada entre ambas líneas celulares, recogido en una tabla de datos. La cantidad total de sustratos ensayados fueron de 126 para las PTK y 136 para las STK.

### 3.9 EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*

#### 3.9.1 Modelo animal empleado

Para evaluar el crecimiento tumoral de las células L929 y varias de sus líneas celulares derivadas *in vivo*, se emplearon ratones machos atímicos, de la cepa Swiss nu/nu, de 6 semanas de edad. Los experimentos con los ratones se llevaron a cabo en el Animalario de la Dra. Blanca Conde (Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza) y en el CIBA (Centro de Investigación Biomédica de Aragón), bajo las recomendaciones europeas de ética en animales y con el permiso de la Comisión Ética de Experimentación Animal de ambos centros de trabajo para el desarrollo de los protocolos de trabajo propuestos. Los ratones se mantuvieron en las condiciones estándar libres de patógenos (bajo un filtro de aire, a una temperatura media de 24°C y con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas), siendo alimentados con agua y comida *ad libitum* durante todos los estudios.

#### 3.9.2 Crecimiento tumoral por inyección subcutánea

En este experimento, desarrollado en el Animalario de la Dra. Blanca Conde, se emplearon dos grupos de tres ratones atímicos cada uno, y se inyectaron 10<sup>6</sup> células L929 o L929dt de forma subcutánea. Se realizó un seguimiento del crecimiento de los tumores cada 2-3 días, midiendo el volumen del tumor con un calibre. La fórmula empleada para calcular el volumen fue la siguiente:

$$Volumen\ tumoral\ (mm^3) = \frac{L \cdot A^2}{2}$$

Donde:

- L: diámetro longitudinal del tumor (mm)
- A: diámetro transversal del tumor (mm)

Los ratones se mantuvieron hasta el día 21 post-inyección, momento en el que se sacrificaron. Los tumores subcutáneos se aislaron, se pesaron y se conservaron en una disolución de paraformaldehído al 10% (v/v). Un fragmento de cada uno de ellos se extrajo para ser analizado a través del microscopio óptico. La preparación de las muestras para el microscopio,

llevada a cabo amablemente por el Dr. Sameer Al-Wasaby, consistió en la fijación de los tumores en formalina, la formación de bloques de parafina, los cortes de los mismos en secciones y tinción con hematoxilina-eosina, siguiendo un protocolo descrito con anterioridad en nuestro grupo (Al-Wasaby et al., 2015).

### 3.9.3 Crecimiento tumoral por inyección intraesplénica

El resto de experimentos *in vivo* se desarrollaron en el Animalario del CIBA, con la ayuda del técnico Eduardo Romanos (Servicio de Imagen Médica y Fenotipado, CIBA) para las inyecciones y la extirpación de los tumores.

En el **primero** de ellos, se inyectaron  $0.125 \times 10^6$  células L929 o L929dt en 50  $\mu$ l de PBS de forma intraesplénica, empleando dos grupos de 5 ratones atímicos en cada uno. Como controles, se emplearon ratones atímicos inyectados con PBS. Al igual que en el caso anterior, los ratones se sacrificaron al día 21 después de la inyección. Seguidamente, se aislaron los bazo de ellos, donde se calculó el volumen del tumor de la misma forma que en el Apartado anterior. Además, se examinaron macroscópicamente los órganos colindantes al bazo para la posible detección de metástasis y se extrajeron los hígados en algunos casos.

Finalmente, otra parte de las muestras de bazo fueron empleadas para el aislamiento de sus mitocondrias y el análisis de la formación de SC's. Para la **preparación de los homogenados tisulares**, las partes de los bazo recién extraídos se introdujeron en vasos de vidrio que contenían medio A (ver *Tabla 3.6*) y se pesaron. Seguidamente, se trocearon finamente con unas tijeras y se lavaron de 3-5 veces con medio A para eliminar la mayor cantidad posible de sangre y pelos. Después, los órganos troceados se homogenizaron mediante adición de 4 ml de medio A por gramo de tejido y 15 pases en un homogeneizador Potter-Dounce con émbolo de teflón a 600 rpm. Una vez obtenidos estos homogenados tisulares, se procedió al aislamiento de mitocondrias y análisis de los SC's tal y como se describe en los *Apartados 3.2.5 y 3.2.6*.

Para el **segundo** experimento, además de las células L929 y L929dt, se emplearon los híbridos derivados de ellas dt<sup>L929</sup> y L929<sup>dt</sup>. En este caso, se emplearon 3 ratones atímicos por grupo (12 en total), a los que se les inyectaron  $0.25 \times 10^6$  células en 50  $\mu$ l de PBS de forma intraesplénica. Al cabo de 21 días, se sacrificaron los ratones y se examinó macroscópicamente la aparición de tumores en el bazo u otros tejidos. Tras extirpar los tumores, se midió el volumen de los mismos y parte de éstos fueron enviados de nuevo al Servicio de Histología del CIBA para la obtención de tinciones de hematoxilina-eosina. El resto de los tumores fueron conservados en una disolución de paraformaldehído al 10% (v/v).

### 3.10 CITOMETRÍA DE FLUJO

Durante esta tesis se emplearon dos citómetros de flujo: un citómetro *FACSCalibur*, perteneciente al Departamento de Bioquímica (Universidad de Zaragoza) y un citómetro *Gallios* (Beckman Coulter), perteneciente al Hospital Universitario de Montpellier (CHRU, Montpellier, Francia). El citómetro FACSCalibur posee dos láseres, uno de 488 nm y otro de 635 nm; por su parte, el citómetro Gallios consta de tres: de 488, de 638 y de 405 nm. Además de esto, mientras que el citómetro FACSCalibur cuenta con cuatro canales de detección (además del FSC y del SSC, que detectan tamaño y granulosidad, respectivamente), el citómetro Gallios posee diez de ellos. Los canales pertenecientes a cada láser y sus longitudes de onda de excitación se recogen en la *Tabla 3.17*.

**Tabla 3.17.** Propiedades de los citómetros de flujo empleados en esta tesis.

FACSCalibur		Gallios (Beckman Coulter)	
Excitación con el láser de 488 nm			
Canal	Fluoróforos usados	Canal	Fluoróforos usados
FSC (Forward Scatter)	-	FSC (Forward Scatter)	-
SSC (Side Scatter)	-	SSC (Side Scatter)	-
FL1: 530 nm	CM-H <sub>2</sub> DCF, CellTracker™ Green, FITC	FL1: 525 nm	FITC, Alexa Fluor® 488  PE
FL2: 585 nm	2HE, PE	FL2: 575 nm	
-	-	FL3: 620 nm	
FL3: 670 nm	7-AAD	FL4: 675 nm	7-AAD
-	-	FL5: 755 nm	PE-Vio 770
Excitación con el láser de 635 o 638 nm			
Canal	Fluoróforos usados	Canal	Fluoróforos usados
FL4: 661 nm	APC, DY634	FL6: 660 nm	APC
-	-	FL7: 725 nm	
-	-	FL8: 755 nm	
Excitación con el láser de 405 nm			
Canal	Fluoróforos usados	Canal	Fluoróforos usados
-	-	FL9: 450 nm	
-	-	FL10: 550 nm	VioGreen, CellTracker™ Violet BMQC

Los datos de las citometrías de flujo se recogieron a través del software CellQuestPro (en el citómetro FACSCalibur) o Kaluza (en el citómetro Gallios) y se analizaron utilizando los programas informáticos FlowJo o Kaluza Analysis Software, respectivamente.

### 3.10.1 Determinación de la translocación de la fosfatidilserina y de daño en la membrana plasmática

A la hora de determinar la muerte celular en los cultivos de manera rutinaria, se empleó la tinción con azul Trypan sobre las células para su conteo en un microscopio óptico (ver *Apartado 3.1.3.1*).

Uno de los primeros eventos que sucede en una célula cuando entra en apoptosis es la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática. La exposición de este fosfolípido permite en condiciones fisiológicas ser detectadas por los macrófagos para su fagocitosis. Por tanto, la translocación de la fosfatidilserina es un adecuado indicador de la **inducción de apoptosis** en las células. Para su determinación, se utilizó la proteína Anexina-V, que se une a este fosfolípido de manera específica. Se han empleado constructos de Anexina-V unida a varios fluoróforos: aloficocianina (APC,  $\lambda_{\text{abs}} = 662 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$ ), DY-634 ( $\lambda_{\text{abs}} = 635 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$ ), ficoeritrina (PE,  $\lambda_{\text{abs}} = 480\text{-}565 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$ ) o isocianato de fluoresceína (FITC,  $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$ ) (Immunostep).

Para realizar este marcaje, se recogieron al menos  $10^5$  células en tubos de citometría y se centrifugaron 5 minutos a 340g. El pellet resultante de cada tubo se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de ABB (*Annexin Binding Buffer*, Hepes-NaOH 10 nM, NaCl 140 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM, pH 7.4) que incluía 1  $\mu\text{l}$  de Anexina-V. Se dejaron incubando durante 15-20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de ABB a cada tubo y las muestras se analizaron en el citómetro de flujo.

El compuesto 7-aminoactinomicina D (**7-AAD**,  $\lambda_{\text{abs}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 647 \text{ nm}$ ) es un fluoróforo que posee afinidad por el DNA y al unirse a él, cambia su absorbancia. En las células sanas, el 7-AAD no atraviesa las membranas y no las marca. Sin embargo, en aquellas cuyas membranas están dañadas, como durante la necrosis o en células que han sufrido el ataque del SI, el 7-AAD sí las marca y se pueden detectar en el citómetro de flujo.

Al igual que en el caso anterior, se partió de un mínimo de  $10^5$  células para realizar el marcaje, las cuales se trasvasaron a tubos de citometría y se centrifugaron 5 minutos a 340g. Cada pellet obtenido se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de PBS con 5% de SFB, se añadió 1.5  $\mu\text{l}$  de 7-AAD (Biolegend) y se dejó incubando 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de PBS con 5% de SFB a cada tubo y las muestras se analizaron en el citómetro de flujo.

### 3.10.2 Determinación de la expresión de proteínas de membrana

A la hora de analizar la expresión de diversas proteínas de superficie en las células, se recogieron al menos de  $10^5$  células, se centrifugaron a 340g durante 5 minutos y se marcaron en un volumen total de 100  $\mu$ l de PBS con un 5% de SFB, durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente, se centrifugaron las células marcadas de la misma forma que antes y se trasvasaron a tubos de citómetro en un volumen mínimo de 300  $\mu$ l de PBS con un 5% de SFB. Finalmente, la expresión de la proteína correspondiente en las muestras fue analizada por citometría de flujo. Los anticuerpos empleados y sus concentraciones se encuentran recogidos en la *Tabla 3.18*.

**Tabla 3.18.** Relación de anticuerpos empleados en citometría de flujo.

Anticuerpo anti-	Tipo, especie	Concentración	Proveedor
CD3 - FITC	mc, ratón	1/50 (v/v)	Miltenyi
CD56 - APC	mc, ratón	1/50 (v/v)	Miltenyi
CD56 - PE	mc, ratón	1/5 (v/v)	BD
DR4 - PE	mc, ratón	5 $\mu$ g/ml	eBioscience
DR5 - PE	mc, ratón	5 $\mu$ g/ml	eBioscience
Fas - FITC	mc, ratón	1/10 (v/v)	eBioscience
HLA-ABC - Viogreen	humanizado	1/100 (v/v)	Miltenyi
ICAM-1 - PE-Vio 770	humanizado	1/100 (v/v)	Miltenyi
MHC-I (H-2K <sup>b</sup> ) - FITC	mc, ratón	10 $\mu$ g/ml	BD
MHC-I (H-2K <sup>k</sup> ) - FITC	mc, ratón	10 $\mu$ g/ml	BD
MICA/B - PE	mc, ratón	1/100 (v/v)	Miltenyi
PD-L1 - PE	mc, ratón	20 $\mu$ g/ml	Biolegend
ULBP-1 - Alexa Fluor®488	mc, ratón	1/100 (v/v)	R&D Systems
Controles de isotipo	Tipo, especie	Concentración	Proveedor
IgG1 $\kappa$ - FITC	ratón	10 $\mu$ g/ml	BD
IgG1 $\kappa$ - PE	ratón	5 $\mu$ g/ml	Thermo
IgG2 $\alpha$ - PE	mc, ratón	20 $\mu$ g/ml	BD
IgG2 $\beta$ - FITC	mc, ratón	1/5 (v/v)	BD

### 3.10.3 Detección de ROS

Para observar la formación de ROS en el interior de las células, se utilizaron los siguientes reactivos: clorometil dihidroclorofluoresceína diacetato (CM-H<sub>2</sub>DCF-DA, Invitrogen), capaz de detectar los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (entre otros radicales) por la formación de clorometil diclorofluoresceína (CM-DCF:  $\lambda_{\text{abs}} = 495$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 529$  nm) al reaccionar con ellos; y dihidroetidio (DHE, Life Technologies), capaz de detectar los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por la formación de 2-hidroetidio (2HE:  $\lambda_{\text{abs}} = 500$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 582$  nm).

Para realizar el marcaje de las muestras, se recogieron  $10^5$  células y tras un lavado con PBS, se incubaron con CM-H<sub>2</sub>DCF-DA o DHE a 2  $\mu$ M en PBS, durante 30 minutos a 37°C. Tras el marcaje, se llevó a cabo un lavado con PBS y se pasaron las muestras por el citómetro de flujo.

### 3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando o bien el test *Two-way ANOVA* o el *t-Student*, empleando el programa GraphPad Prism 6 o Microsoft Excel 2016.





# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



## 4.1 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD SENSIBILIZADORA DEL DCA Y LA METFORMINA A LA ACCIÓN CITOTÓXICA DE eCTL's Y eNK's EN TUMORES HEMATOLÓGICOS

A pesar de los grandes avances en inmunoterapia en los últimos años, las neoplasias de origen hematológico siguen siendo enfermedades incurables. Además de esto, la quimioterapia constituye una de las principales herramientas para enfrentarse a este tipo de tumores. Por tanto, en esta primera parte del trabajo, se ha estudiado un tratamiento combinado, utilizando drogas metabólicas para susceptibilizar a los tumores a la acción de linfocitos T citotóxicos (CTL) o de células NK activadas y expandidas.

### 4.1.1 Obtención de eCTL's y células eNK a partir de UCB-MC y PBMC

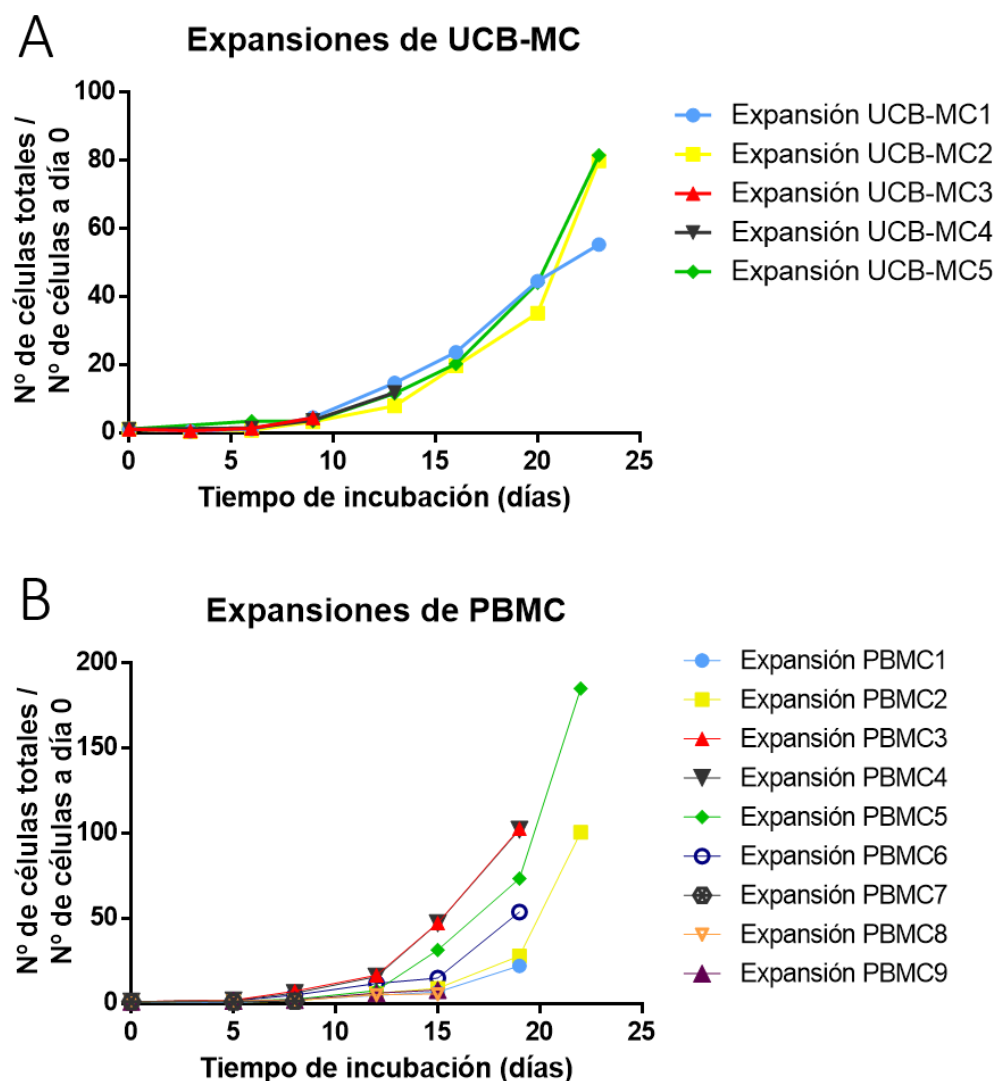
En este trabajo se han usado como células efectoras anti-tumorales CTL o células NK obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical (UCB, del inglés *Umbilical Cord Blood*), proporcionadas por el Hospital Universitario de Montpellier (CHRU, Montpellier, Francia), o bien a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), de donantes sanos (*LeukoPacks*), proporcionados por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón.

Para la expansión y activación de los CTL y las células NK provenientes tanto de UCB como de sangre periférica, se aislaron primeramente los UCB-MC y PBMC (respectivamente) tal como se indica en el *Apartado 3.1.4.1*. Brevemente, se separaron las células mononucleares del resto de componentes por centrifugación en gradiente de Ficoll y obtención de la interfase donde se encontraban las células de interés. Seguidamente, se determinó el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup> o de células CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> por citometría de flujo y se pusieron en cultivo, a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml, en presencia de IL-2 (100 IU/ml), IL-15 (25 IU/ml) y células estimuladoras (células PLH inactivadas) en un ratio de 1:1. El uso de la línea celular linfoblastoide transformada con el EBV PLH como célula estimuladora viene justificado por la expresión de numerosos haplotipos del HLA en superficie (Marsh et al., 2010), lo que permite la activación de linfocitos T alogénicos a través de la unión del mismo con el TCR/CD3. Además de esto, en el caso de las células de UCB, la presencia del HLA en las células PLH es necesaria para que se produzca la maduración de las células NK (Y. He & Tian, 2017).

Estas expansiones se mantuvieron un máximo de 24 días, comprobando regularmente el crecimiento de las células y la proporción de células CD3<sup>+</sup> o CD56<sup>+</sup> por citometría de flujo. Cada

3-5 días, las células se volvieron a sembrar a la concentración inicial, renovando el medio con las interleucinas y las células estimuladoras.

Durante esta parte del trabajo, se emplearon un total de 5 expansiones de UCB y 9 de PBMC de distintos donantes, todas ellas empleadas en los experimentos de citotoxicidad que se mostrarán en los próximos apartados.

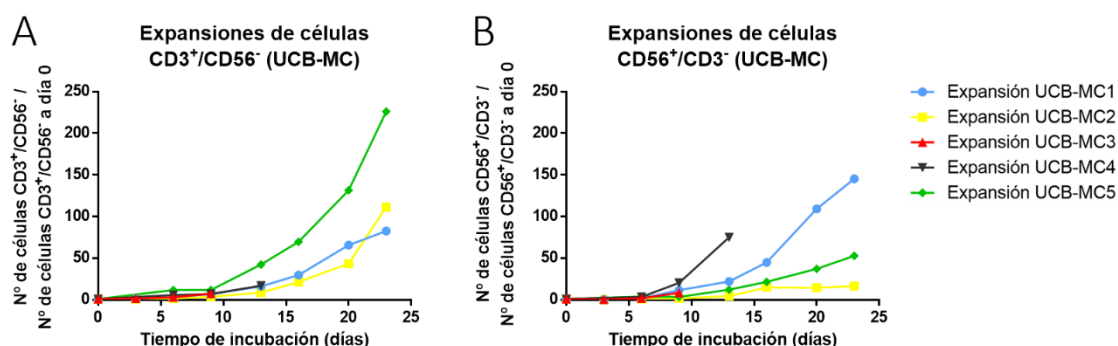


**Figura 4.1.** Crecimiento de las células mononucleares durante las expansiones *in vitro*. Los resultados se muestran como el número de veces que se ha expandido cada muestra proveniente de: (A) UCB-MC y (B) PBMC, respecto a la cantidad de células a día 0.

La Figura 4.1 refleja el número de veces que se han expandido las células mononucleares a cada tiempo de incubación, normalizado por la cantidad total de célula al comienzo de su cultivo. Para los cultivos de UCB-MC, se puede comprobar que el protocolo de expansión empleado permite a las células crecer de forma exponencial hasta el día 23 de expansión (con un máximo de 82 veces en el caso de la expansión del UCB-MC5), comenzando a expandirse a partir

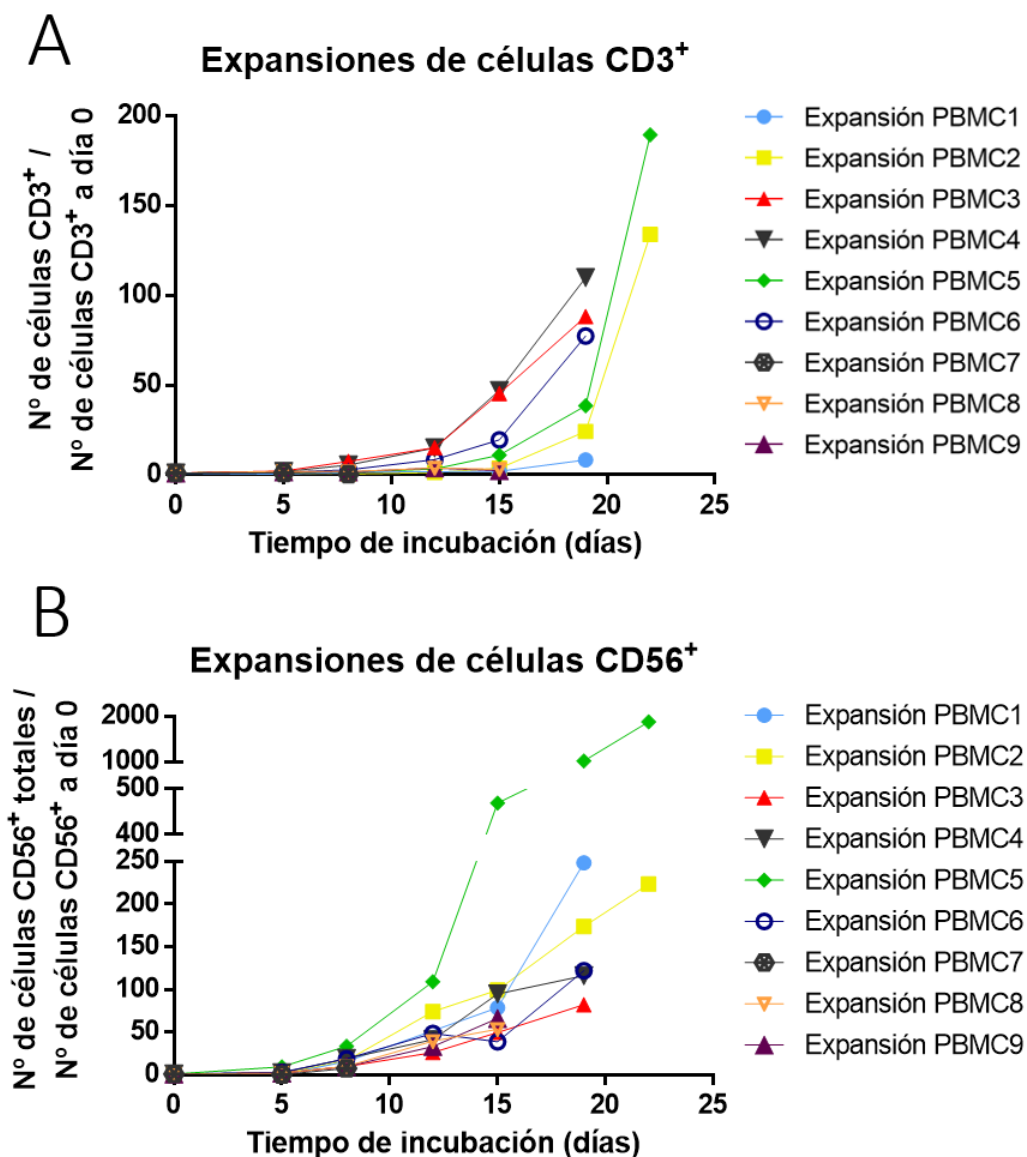
de la primera semana de incubación (*Figura 4.1A*). Para las expansiones provenientes de los UCB-MC3 y UCB-MC4, no se llegaron a completar los ciclos completos de expansión por el empleo de todas las células en cultivo para los experimentos de citotoxicidad (*Figura 4.1A*). En cuanto a las expansiones derivadas de PBMC, al igual que ocurre con los UCB-MC, progresan en cultivo de forma exponencial hasta la tercera semana de expansión (*Figura 4.1B*). Si bien el número de muestras empleadas para la expansión de PBMC fue mayor que para la de UCB, parece haber una mayor variabilidad en el comienzo de la fase exponencial de crecimiento, empezando alrededor del día 10 para las expansiones de PBMC3-5 y sobre el día 15 para las expansiones de PBMC1,2 y 6 (*Figura 4.1B*). Respecto al número de veces de expansión, las muestras de PBMC que se mantuvieron más de 15 días en cultivo crecieron una media de 64 (para día 19 de incubación) y 143 veces (para día 22 de incubación), con un máximo de 185 veces para la expansión PBMC5 (*Figura 4.1B*), obteniéndose así un promedio de expansión mayor que los obtenidos para los UCB-MC (41 veces para día 20 y 72 veces para día 23, ver *Figura 4.1A*).

Los resultados mostrados en la *Figura 4.2* muestran la expansión relativa de células  $CD3^+/CD56^-$  (linfocitos T) o  $CD56^+/CD3^-$  (células NK) totales expandidas en relación con el número de células a día 0 de cada tipo para cada una de las expansiones de UCB-MC. A modo general, se puede observar que, en los UCB-MC que llegaron a la tercera semana de cultivo, la cantidad de células  $CD3^+$  expandidas fue mayor que la de las células  $CD56^+$  (con una media de 140 veces para las células  $CD3^+$  y 70 veces para las células  $CD56^+$ , respecto a día 0), alcanzando un máximo de 226 veces expandidas para las células  $CD3^+$  en la expansión UCB5 (*Figura 4.2A*) y de 145 veces para las células  $CD56^+$  en la expansión UCB1 (*Figura 4.2B*). Además de esto, cabe destacar que la proporción de células  $CD3^+$  o  $CD56^+$  varió dependiendo del donante, apreciándose un mayor crecimiento de células  $CD3^+$  en las expansiones de UCB2 y UCB5, pero una mayor cantidad de células  $CD56^+$  en las expansiones de UCB1 y UCB4 (*Figura 4.2*).



**Figura 4.2.** Crecimiento de las células (A)  $CD3^+/CD56^-$  o (B)  $CD56^+/CD3^-$  en los cultivos de las UCB-MC durante el periodo de expansión *in vitro* de las mismas. Los resultados se muestran como el número de veces que se ha expandido cada tipo celular a cada tiempo respecto a la cantidad de células inicial de ese tipo a día 0.

Tal y como se muestra en la *Figura 4.3*, y a diferencia de lo obtenido en las expansiones de UCB (*Figura 4.2*), fueron en estos casos las células  $CD56^+/CD3^-$  aquellas que se expandieron en mayor medida. En las expansiones que se mantuvieron más de dos semanas en cultivo, las células  $CD56^+/CD3^-$  se expandieron una media de 294 veces a día 19 y 1050 veces a día 22 de incubación (2 datos, *Figura 4.3B*), mientras que las células  $CD3^+/CD56^-$  crecieron de media 58 veces la cantidad inicial para el día 19, y 162 veces para el día 22 (*Figura 4.3A*).



**Figura 4.3.** Crecimiento de las células (A)  $CD3^+$  o (B)  $CD56^+$  en los cultivos de las PBMC durante el periodo de expansión in vitro de las mismas. Los resultados se muestran como el número de veces que se ha expandido cada tipo celular a cada tiempo respecto a la cantidad de células inicial de ese tipo a día 0.

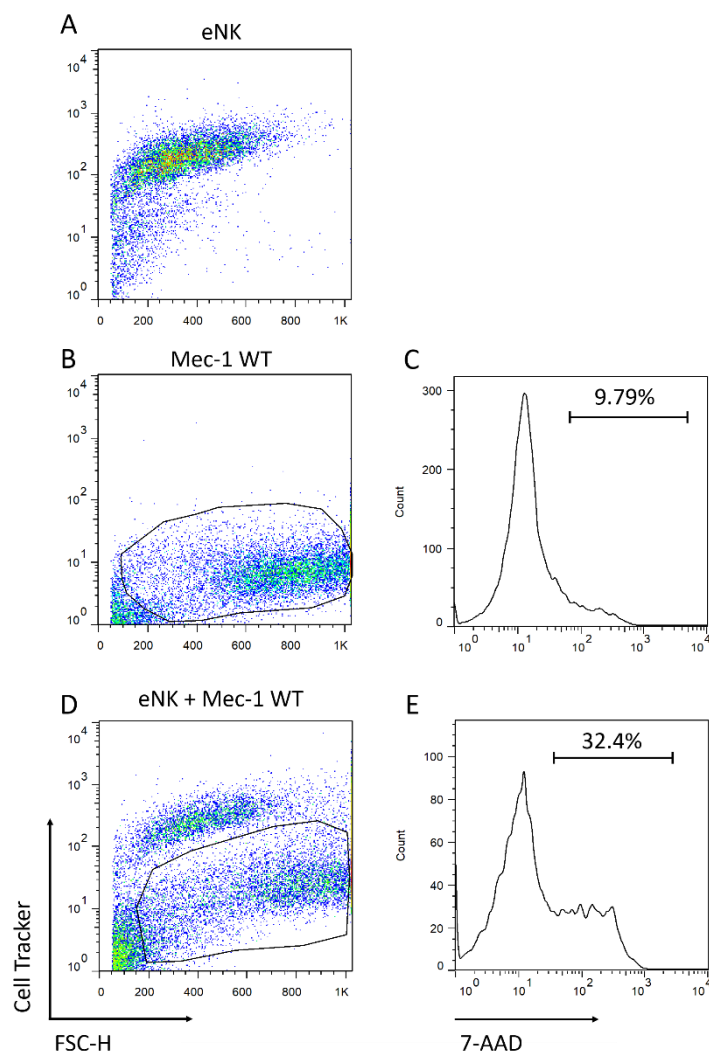
#### 4.1.2 Efecto de la metformina sobre la sensibilización de los tumores a la acción citotóxica de los eCTL y células eNK

Una forma de sensibilizar a los tumores a la acción de otros fármacos o terapias es mediante la remodelación del metabolismo energético de los mismos (Villalba et al., 2014). La metformina es un fármaco empleado desde hace décadas en la clínica, en este caso para el tratamiento de la diabetes tipo 2, con efectos secundarios mínimos y que se ha asociado con una menor prevalencia de cáncer en estos pacientes (Evans et al., 2005). Las líneas celulares tumorales empleadas en esta parte del trabajo fueron: las líneas celulares de B-CLL Mec-1 WT y la sub-línea derivada que expresa Bcl-x<sub>L</sub> (Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>), las de mieloma múltiple MM.1S y U266, y la de linfoma histiocítico U937.

##### 4.1.2.1 *Capacidad citotóxica de los eCTL y las células eNK provenientes de UCB y PBMC sobre los tumores pre-tratados con metformina*

A partir del día 7 de expansión, los CTL y las células NK en cultivo se consideraron lo suficientemente activados (*eCTL* y *eNK*) como para comenzar a emplearlos en los experimentos de citotoxicidad contra las células tumorales. Dado que ambas poblaciones se encuentran en el mismo cultivo, fue necesaria una separación previa mediante el uso de anticuerpos dirigidos a CD3 o CD56 unidos a bolas magnéticas, permitiendo así la retención de la población que exprese uno u otro marcador del resto al exponerlas a un campo magnético.

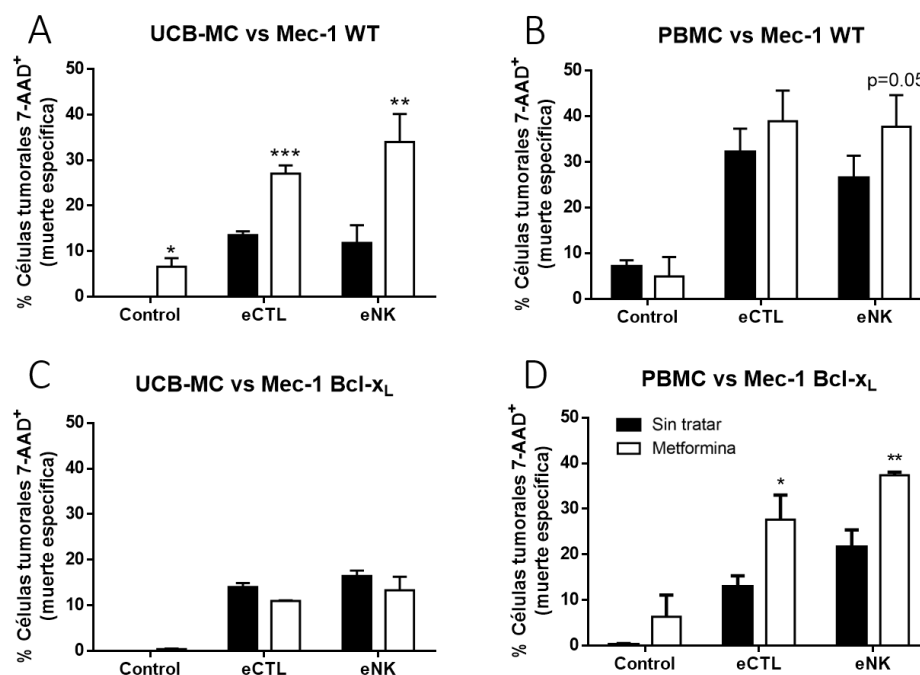
Una problemática que surge al mezclar ambas células inmunitarias con los tumores es la necesidad de distinguir ambas poblaciones. Es por ello que, antes de enfrentarlas entre sí, los *eCTL* o las *eNK* aisladas se marcaron con una sonda intracelular fluorescente (ver *Apartado 3.1.4.2*). En la *Figura 4.4A* se muestra un ejemplo ilustrativo del marcaje obtenido por citometría de flujo, así como de las células tumorales sin la sonda fluorescente (*Figura 4.4B*) y la distinción de ambas poblaciones una vez mezcladas en el ensayo (*Figura 4.4D*).



**Figura 4.4.** Ejemplo de un ensayo de citotoxicidad, empleando células eNK contra las células de B-CLL Mec-1 WT, medido por citometría de flujo. En (A) se muestran las células eNK solas marcadas con la sonda intracelular fluorescente CellTracker™ frente a FSC-H. Las células Mec-1 WT, sin marcar, se muestran a solas en (B). La muerte basal de estas células se evaluó por marcaje con 7-AAD (C). Ambas poblaciones se mezclaron en un ratio de 1:1 (e:t) y se dejaron incubar hasta el día siguiente. El marcaje previo con CellTracker™ permitió la distinción de las eNK y las células tumorales (D). Finalmente, para evaluar la muerte en las células tumorales, se acotó una región de aquellas células no marcadas con la sonda fluorescente y se analizó por marcaje con 7-AAD (E).

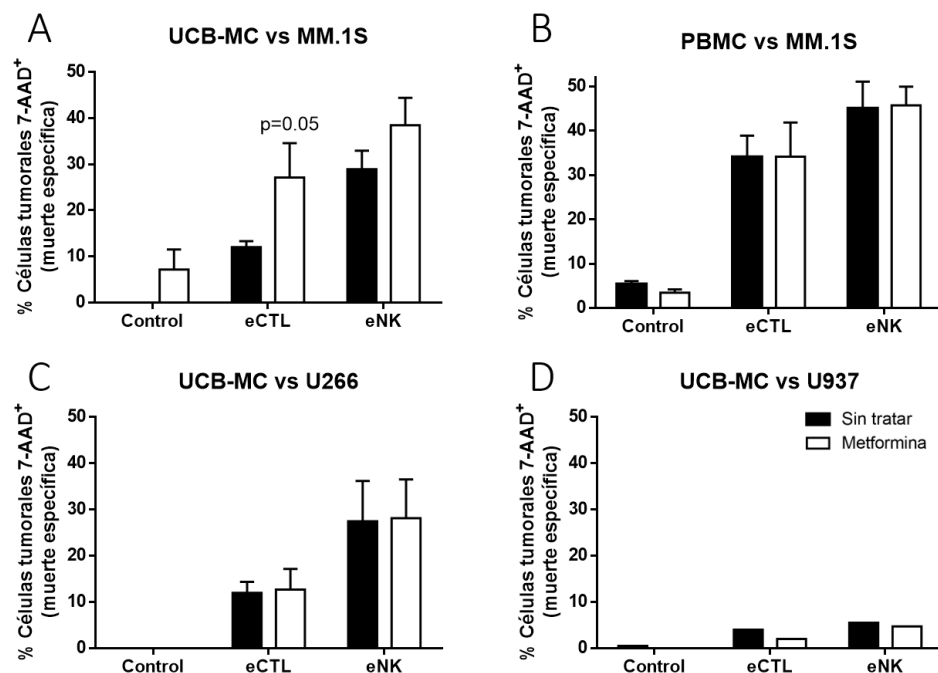
Los tumores fueron pre-incubados durante 72 horas con metformina (2 mM) antes de los experimentos de citotoxicidad. Paralelamente, se obtuvieron y aislaron los eCTL y células eNK derivados de los UCB-MC y PBMC como se ha descrito en el apartado anterior. Posteriormente, fueron marcadas con una sonda fluorescente para distinguirlas de la población tumoral, y enfrentadas, en ratio 1:1 (célula efectora:célula diana, e:t). La muerte celular inducida en los tumores se evaluó por marcaje con 7-AAD y análisis por citometría de flujo.





**Figura 4.5.** Sensibilidad de las líneas celulares tumorales tratadas con metformina a la acción citotóxica de los eCTL o las células eNK (parte I). Los gráficos muestran el porcentaje de células tumorales 7-AAD<sup>+</sup> tras incubación durante 72 horas con metformina (2 mM) y enfrentadas posteriormente a eCTL o eNK provenientes de (A),(C) UCB-MC o (B),(D) PBMC durante 16 horas a un ratio de 1:1 (e:t), expresado como muerte celular específica. Las líneas celulares tumorales empleadas son las líneas de B-CLL (A),(B) Mec-1 WT y (C),(D) Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de al menos 2 experimentos. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Los resultados obtenidos para este tratamiento sobre las células de B-CLL mostraron, por una parte, que la metformina, a la dosis utilizada, es capaz de sensibilizar a las células Mec-1 WT a la acción citotóxica tanto de los eCTL como de las células eNK derivadas de los UCB-MC (*Figura 4.5A*). Se puede observar una tendencia parecida empleando células inmunitarias provenientes de los PBMC, que llega prácticamente a ser significativa en el caso de las eNK (*Figura 4.5B*). Por otra parte, este efecto sensibilizador de la metformina no se observa en la sub-línea derivada Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> empleando UCB-MC (*Figura 4.5C*), pero sí que se manifiesta tanto para eCTL como para eNK provenientes de PBMC (*Figura 4.5D*). De hecho, este tratamiento consigue elevar dicha citotoxicidad a los niveles de la muerte celular inducida por los eCTL y células eNK provenientes de PBMC sobre las células Mec-1 WT (*Figura 4.5B*).

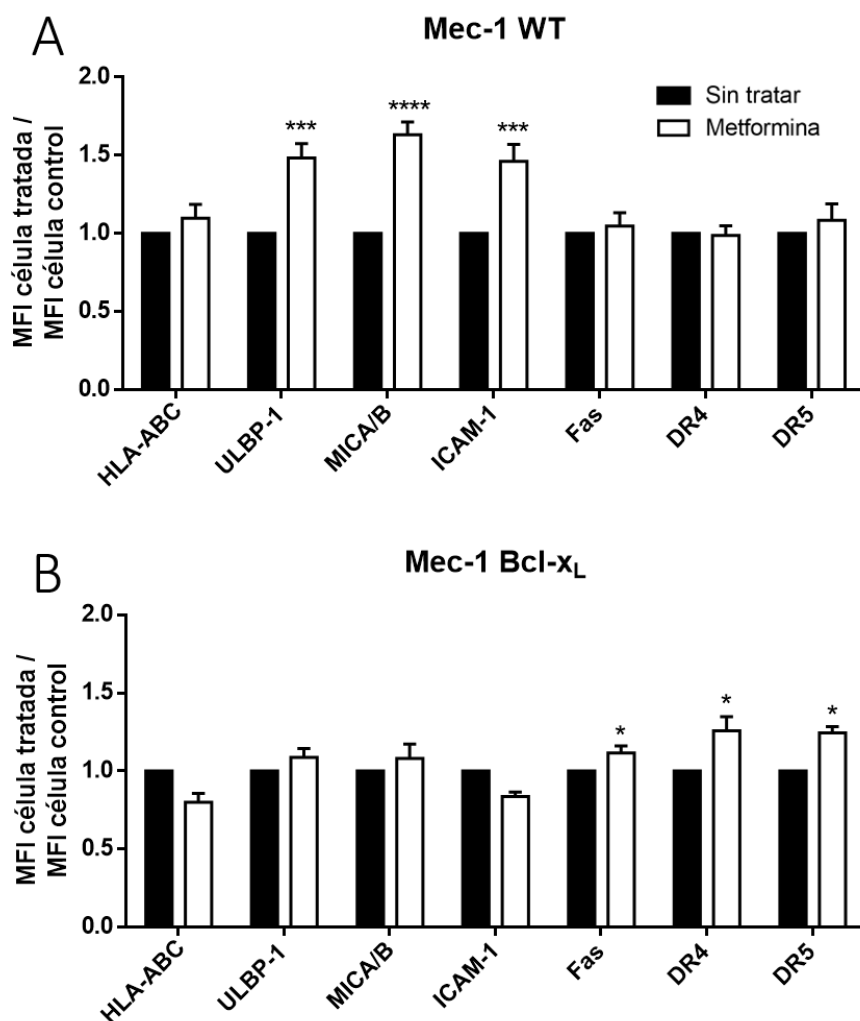


**Figura 4.6.** Sensibilidad de las líneas celulares tumorales tratadas con metformina a la acción citotóxica de los eCTL o las células eNK (parte II). Los gráficos muestran el porcentaje de células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación durante 72 horas con metformina (2 mM) y enfrentadas posteriormente a eCTL o eNK provenientes de (A),(C),(D) UCB-MC o (B) PBMC durante 16 horas a un ratio de 1:1 (e:t), expresado como muerte celular específica. Las líneas celulares tumorales empleadas son: las líneas de mieloma múltiple (A),(B) MM.1S y (C) U266, y la línea de linfoma histiocítico (D) U937. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de al menos 2 experimentos (A-C), siendo  $n=1$  para (D).

También se ensayó esta terapia combinada sobre las líneas celulares de mieloma múltiple MM.1S y U266 y sobre la línea celular de linfoma histiocítico U937. Para las células MM.1S, el tratamiento empleando los eCTL y células eNK provenientes de UCB-MC parece indicar una tendencia hacia una cierta susceptibilización, si bien las diferencias no resultaron significativas (Figura 4.6A). No obstante, esta tendencia no pudo observarse cuando se emplearon las células inmunitarias derivadas de PBMC (Figura 4.6B). Además de esto, tampoco se observó sensibilización sobre las células U266, ni inducción de citotoxicidad en las células U937, tras tratamiento de éstas con los eCTL y células eNK provenientes de UCB-MC (Figura 4.6C,D).

#### 4.1.2.2 Efecto de la metformina sobre la expresión de proteínas en los tumores ensayados

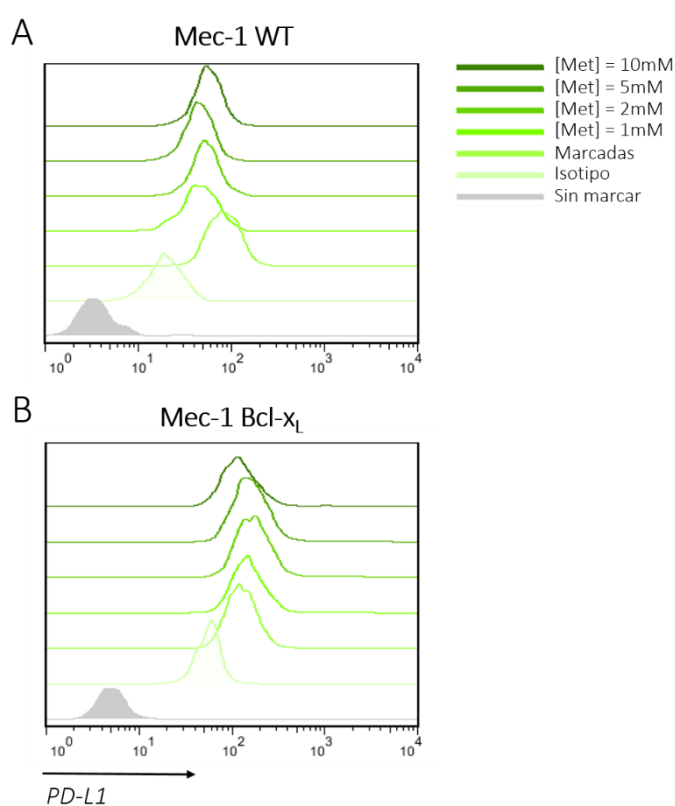
Seguidamente, se estudió por citometría de flujo si el tratamiento con metformina afectaba a la expresión en los tumores de receptores de superficie relevantes para la función de los CTL o las células NK: HLA-ABC; ULBP-1 y MICA/B (receptores de NKG2D); ICAM-1 (receptor de LFA-1) y los receptores mortales Fas, DR4 y DR5. Finalmente, tras el marcaje, las células se lavaron y se analizó la expresión de estas proteínas por citometría de flujo.



**Figura 4.7.** Expresión de los receptores de superficie HLA-ABC, ULBP-1, MICA/B, ICAM1, Fas, DR4 y DR5 tras incubación durante 72 horas con metformina (2 mM) en las líneas celulares de B-CLL: (A) Mec-1 WT y (B) Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>. Los datos se presentan como la variación normalizada relativa de la expresión de las células tratadas respecto a las células sin tratar. Los resultados son la media  $\pm$  SD de al menos 3 experimentos diferentes. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

En la *Figura 4.7* se recogen los resultados para las líneas celulares de B-CLL. Como se puede observar, la metformina induce un aumento significativo de la expresión de los receptores ULBP-1, MICA/B e ICAM-1 en las células Mec-1 WT (*Figura 4.7A*). Sin embargo, estos aumentos no se observan en las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, pero en este caso sí se produce un incremento en la expresión de los receptores mortales Fas, DR4 y DR5 (*Figura 4.7B*). Además de esto, la expresión basal de ICAM-1 era elevada (media de las MFI: 109.2 para las células Mec-1 WT y 185.8 para las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>), mientras que fue moderada para Fas, DR4 y DR5 (medias de las MFI: 13.5, 12.9 y 12.6, respectivamente, para las células Mec-1 WT, y 13.1, 13.6 y 14.0 para las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>), y baja para el resto de receptores (medias de las MFI: 5.3, 0.9 y 1.5 para HLA-ABC, ULBP-1 y MICA/B, respectivamente, para las células Mec-1 WT, y 10.1, 0.6 y 1.8 para las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>), siendo en cualquier caso una cantidad detectable y, por tanto, susceptible de ser empleada por las células del SI.

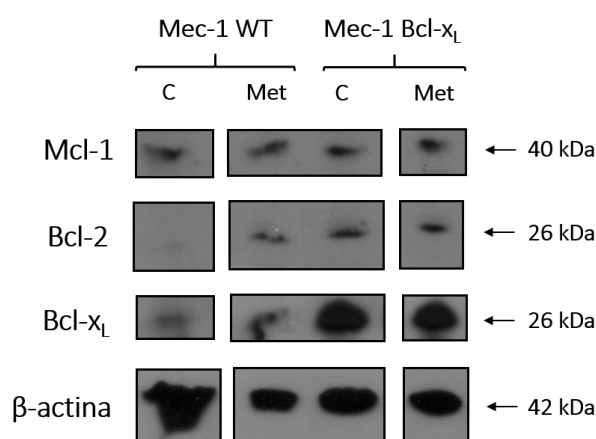
Otra proteína de superficie cuya expresión se quiso estudiar en las células de B-CLL fue el ligando de inhibición de CTL y células NK PD-L1. Para ello, se incubaron las líneas celulares durante 72 horas con dosis crecientes de metformina (1-10 mM) y se analizó la expresión de esta proteína por citometría de flujo.



**Figura 4.8.** Expresión de PD-L1 en superficie en las líneas celulares de B-CLL: (A) Mec-1 WT y (B) Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>. Las células se incubaron a dosis crecientes de metformina (1-10 mM) durante 72 horas. Posteriormente, la expresión de PD-L1 se analizó por citometría de flujo.

Los resultados se recogen en la *Figura 4.8*. Como se puede observar, ambas líneas celulares poseen unos niveles detectables de PD-L1 (MFI: 88.8 para las células Mec-1 WT y 164.0 para las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>). Además de esto, la metformina induce una bajada en la expresión de este ligando inhibitorio de forma dosis-dependiente (*Figura 4.8A*). Este efecto no parece observarse en las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> (*Figura 4.8B*).

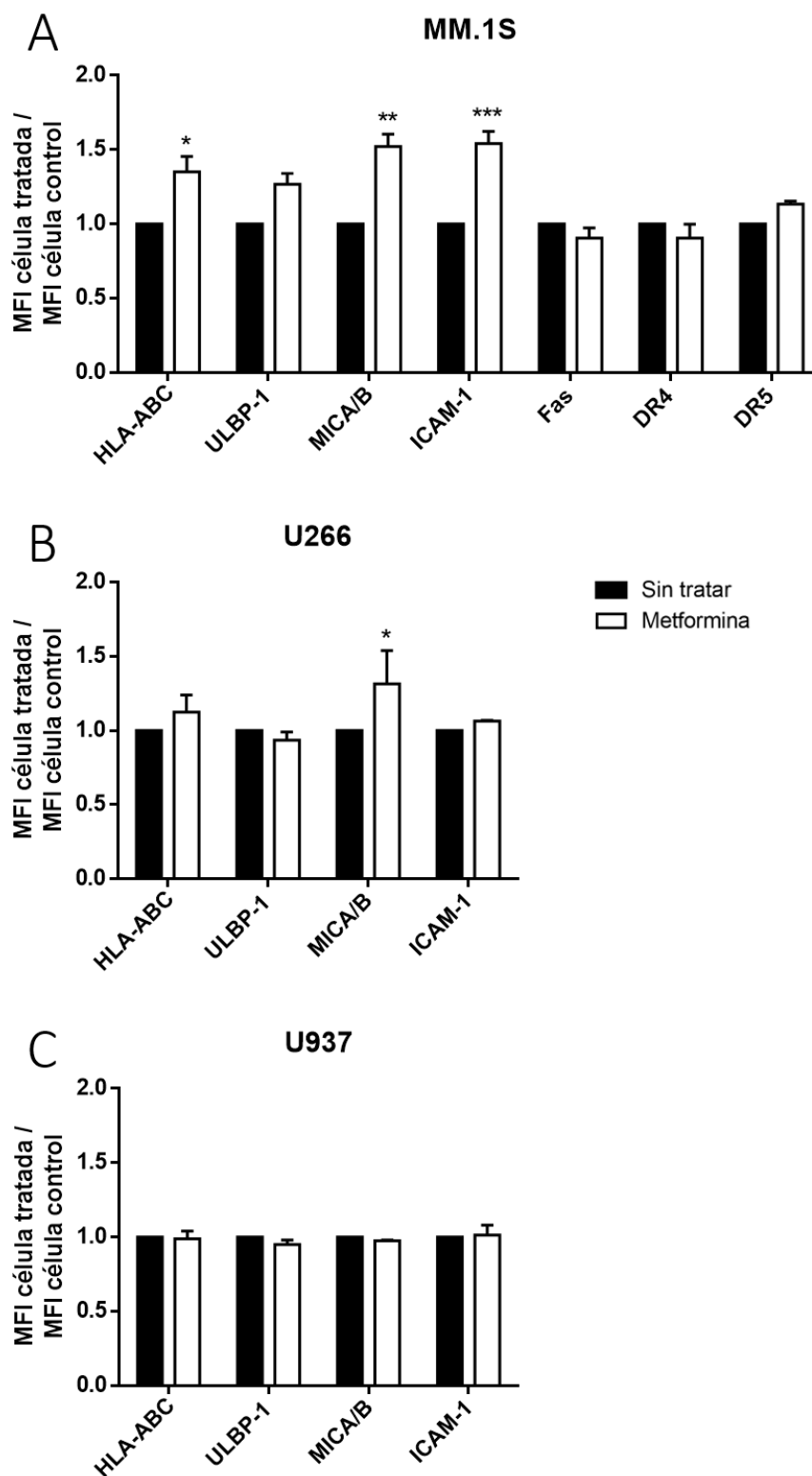
También se quiso evaluar para el caso de las líneas celulares de B-CLL la expresión de varias proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2: Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>. Para ello, se recogieron extractos celulares de dichos tumores tratados o sin tratar con metformina (2 mM) durante 72 horas. Tras esto, se separaron las proteínas por electroforesis, se transfirieron a una membrana y se llevaron a cabo inmunoblots de las proteínas de interés.



**Figura 4.9.** Niveles de expresión de las proteínas Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> en las líneas celulares Mec-1 WT y Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>. Las líneas celulares se cultivaron a una densidad de  $3 \times 10^5$  cél/ml en presencia o ausencia ("C") de metformina (2 mM) durante 72 horas y se recogieron un mínimo de  $3 \times 10^6$  células para la obtención de extractos celulares. Las proteínas de interés en estos extractos se analizaron por Western-Blot.

Se puede observar la inducción de la expresión de Bcl-2 cuando las Mec-1 WT son incubadas con metformina (*Figura 4.9*). Respecto al resto de proteínas y líneas ensayadas, no parece haber ninguna variación significativa por efecto de la metformina (*Figura 4.9*).

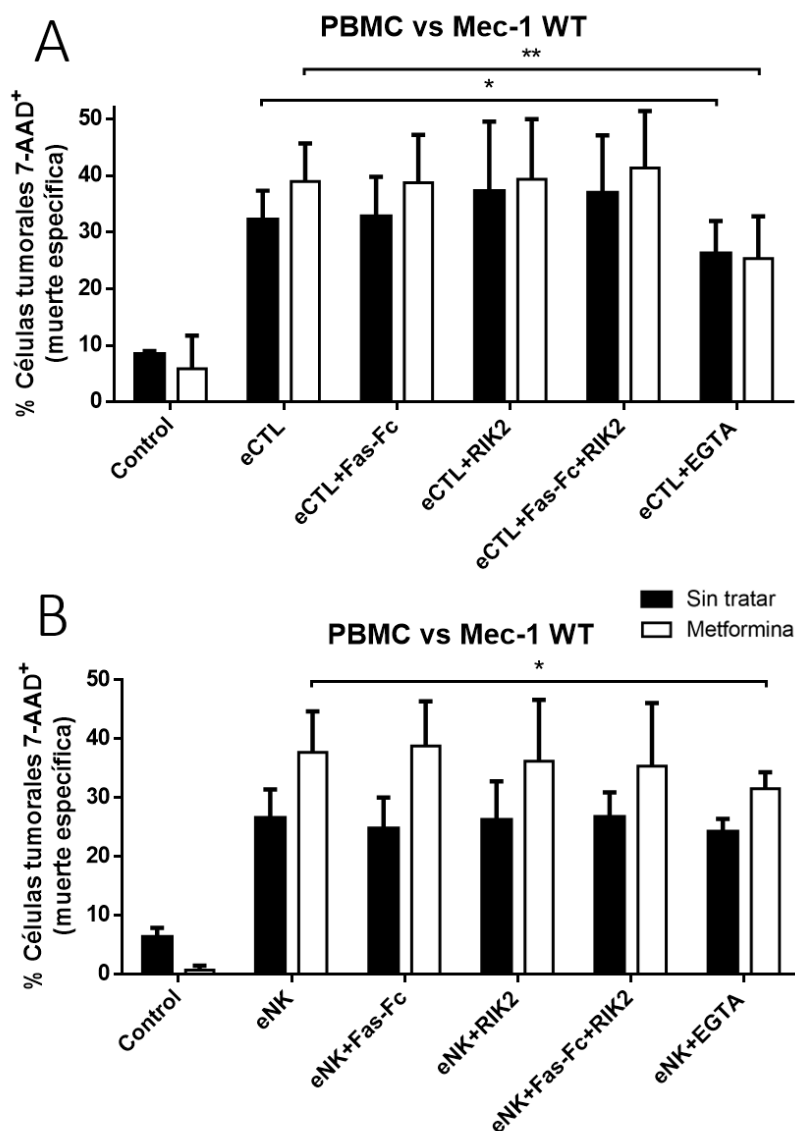
Por otro lado, la expresión de las proteínas en superficie ya nombradas se analizó también en las líneas celulares de mieloma múltiple y en las células U937 tras ser pre-incubadas con metformina. Como se puede apreciar en la *Figura 4.10A*, la expresión de HLA-ABC, MICA/B e ICAM-1 se incrementó significativamente tras la exposición a este fármaco en las células MM.1S. Estas células presentan una expresión moderada de ICAM-1 y los DR's, y baja para el resto de receptores (media de las MFI: 41.6 para ICAM-1; 19.7 para DR4; 18.8 para DR5; 7.3 para HLA-ABC; 1.2 para ULBP-1; 12.6 para MICA/B y 9.2 para Fas). De las proteínas analizadas en las células U266, sólo ICAM-1 aumentó de forma significativa (*Figura 4.10B*). Finalmente, no hubo variación alguna en la expresión de las proteínas de superficie medidas en las células U937 (*Figura 4.10C*).



**Figura 4.10.** Expresión de los receptores de superficie HLA-ABC, ULBP-1, MICA/B, ICAM1, Fas, DR4 y DR5 tras incubación durante 72 horas con metformina (2 mM) en las líneas celulares de mieloma múltiple: (A) MM.1S y (B) U266; y en (C) la línea celular de linfoma histiocítico U937. Los datos se presentan como la variación normalizada relativa de la expresión de las células tratadas respecto a las células sin tratar. Los resultados son la media  $\pm$  SD de al menos 3 experimentos diferentes. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

#### 4.1.2.3 Estudio de los mecanismos de sensibilización a los eCTL y eNK por parte de la metformina

Una vez analizados los posibles cambios en varias proteínas del tumor involucradas en la sensibilización del mismo a las células inmunitarias, se evaluó su verdadera contribución utilizando anticuerpos o reactivos bloqueantes de receptores concretos.

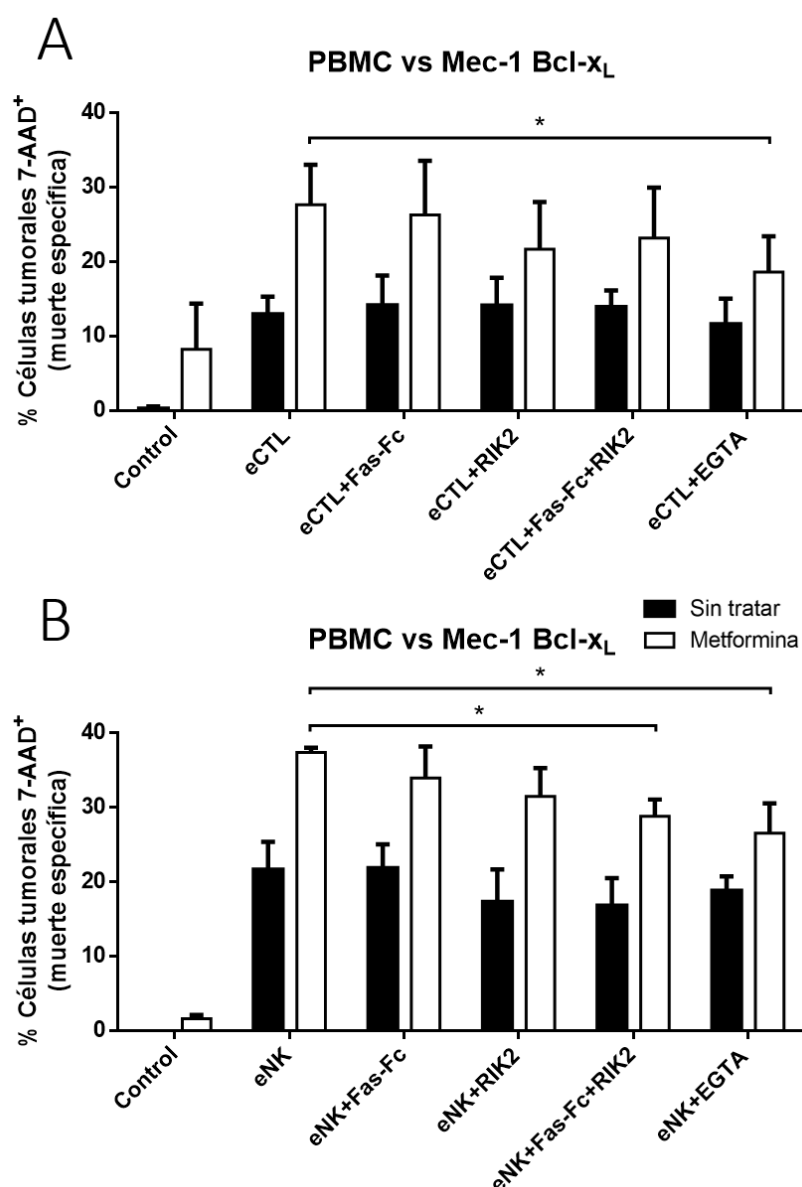


**Figura 4.11.** Contribución de las interacciones Fas-FasL y TRAIL-DR4/DR5 y de la exocitosis granular en la citotoxicidad inducida, en las células Mec-1 WT, por los (A) eCTL y (B) las células eNK. Los gráficos muestran el porcentaje de las células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación previa durante 72 horas con metformina (2 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias previamente incubadas durante 1 hora con EGTA (1 mM, quelante de  $Ca^{2+}$ ), Fas-Fc (10 ng/ml, bloqueante de Fas-L) y/o RIK2 (2.5  $\mu$ g/ml, bloqueante de TRAIL). Los resultados se muestran como la media de la muerte celular específica  $\pm$  SD de  $n=3$ . \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ .

En primer lugar, se analizó la contribución de las interacciones de los ligandos mortales FasL y TRAIL con sus receptores (Fas y DR4/DR5, respectivamente), así como del mecanismo de exocitosis granular, en la muerte celular inducida por los eCTL y células eNK derivados de PBMC en los tumores tras pre-incubación con metformina. Se emplearon siguientes compuestos: Fas-Fc, bloqueante de FasL (10 ng/ml); el anticuerpo monoclonal RIK2, bloqueante de TRAIL (2.5

$\mu\text{g/ml}$ ); y el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA (1 mM). Estos compuestos fueron incubados con las células efectoras una hora antes de sembrarlas sobre los tumores para los ensayos de citotoxicidad.

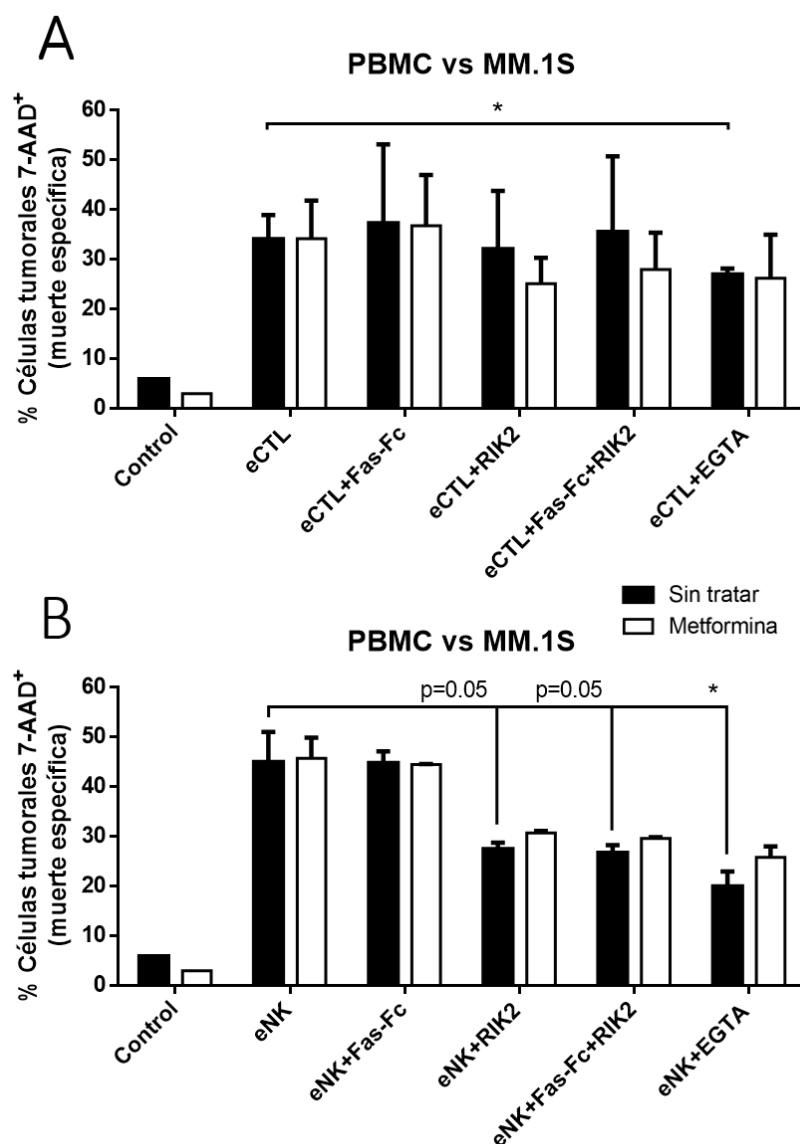
En la *Figura 4.11* se muestran los resultados obtenidos en la línea celular Mec-1 WT. Como se puede observar, ni el bloqueo de Fas-FasL ni el de TRAIL-DR4/DR5 implicó un cambio en la muerte celular inducida por ninguno de los dos tipos de células efectoras. En el caso del EGTA, sí puede verse una disminución en la media de la citotoxicidad cuando los tumores fueron incubados con metformina, y también sin tratar para el caso de los eCTL (*Figura 4.11*).



**Figura 4.12.** Contribución de las interacciones Fas-FasL y TRAIL-DR4/DR5 y de la exocitosis granular en la citotoxicidad inducida, en las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, por los (A) eCTL y (B) las células eNK. Los gráficos muestran el porcentaje de las células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación previa durante 72 horas con metformina (2 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias previamente incubadas durante 1 hora con EGTA (1 mM, quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ ), Fas-Fc (10 ng/ml, bloqueante de Fas-L) y/o RIK2 (2.5  $\mu\text{g/ml}$ , bloqueante de TRAIL). Los resultados se muestran como la media de la muerte celular específica  $\pm$  SD de  $n=3$ . \* $p<0.05$ .



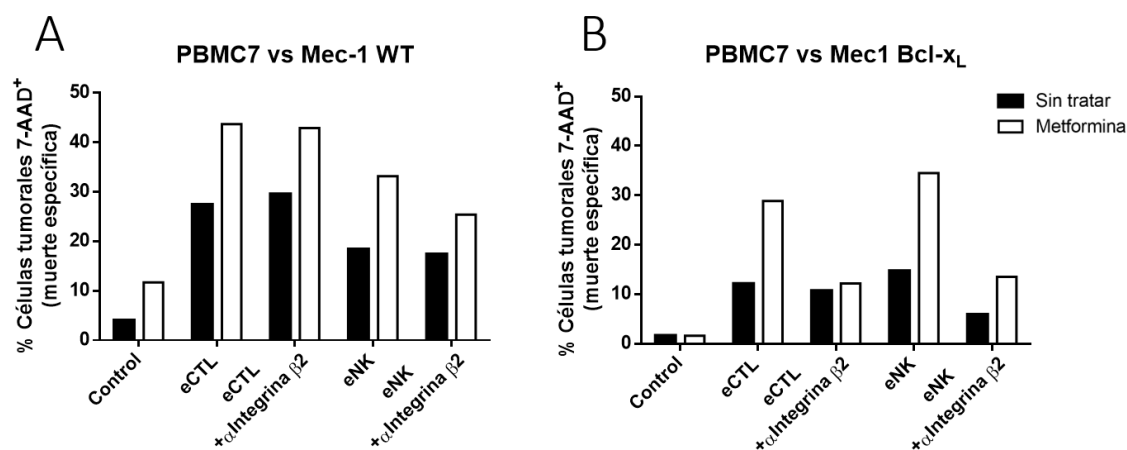
Respecto a las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, los resultados empleando los eCTL como células efectoras muestran una cierta bajada en la citotoxicidad tras su incubación con RIK2 o con EGTA, sugiriendo una cierta influencia de la interacción TRAIL-DR4/DR5 y especialmente del sistema perforina-granzima en su mecanismo de acción (*Figura 4.12A*). En cuanto a las eNK, sí se observa una reducción significativa de la susceptibilización inducida por la metformina tras el bloqueo de la degranulación con EGTA, así como bloqueando simultáneamente a FasL y a TRAIL (*Figura 4.12B*). Sin embargo, la baja citotoxicidad basal que se observa sobre estas células apenas es afectada por estos bloqueos.



**Figura 4.13.** Contribución de las interacciones Fas-FasL y TRAIL-DR4/DR5 y de la exocitosis granular en la citotoxicidad inducida, en las células MM.1S, por los (A) eCTL y (B) las células eNK. Los gráficos muestran el porcentaje de las células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación previa durante 72 horas con metformina (2 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias previamente incubadas durante 1 hora con EGTA (1 mM, quelante de Ca<sup>2+</sup>), Fas-Fc (10 ng/ml, bloqueante de Fas-L) y/o RIK2 (2.5 µg/ml, bloqueante de TRAIL). Los resultados se muestran como la media de la muerte celular específica ± SD de n=2. \*p<0.05.

Finalmente, aunque no se haya observado susceptibilización de la metformina en las células MM.1S a la acción citotóxica de las células inmunitarias provenientes de PBMC (*Figura 4.6B*), se realizaron experimentos similares de bloqueo para caracterizar los mecanismos de muerte implicados en la acción antitumoral de eCTL y eNK (*Figura 4.13*). El bloqueo con EGTA disminuye la citotoxicidad para ambos tipos de células efectoras, demostrando un papel importante del sistema perforina-granzimas en la citotoxicidad (*Figura 4.13*), mientras que para las eNK, también se observa una bajada significativa en la muerte celular al bloquear TRAIL (*Figura 4.13B*).

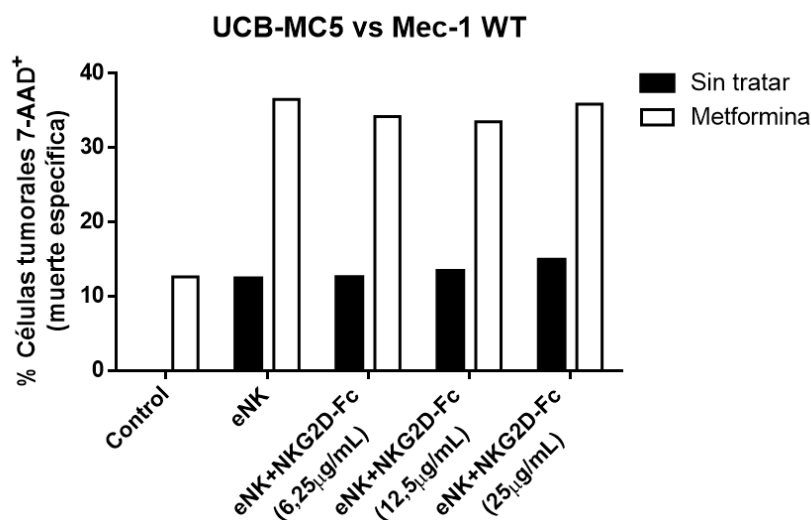
Seguidamente, se realizaron bloqueos de la interacción entre LFA-1 e ICAM-1. Las células tumorales se incubaron durante una hora previa al experimento de citotoxicidad con un anticuerpo anti-Integrina  $\beta 2$  (10  $\mu\text{g/ml}$ , R&D Systems). Seguidamente, se enfrentaron a los eCTL y a las células eNK derivadas de la expansión PBMC7 y se analizaron los resultados de citotoxicidad.



**Figura 4.14.** Contribución de la interacción ICAM-1-LFA-1 en la citotoxicidad inducida por los eCTL y células eNK en las líneas celulares: (A) Mec-1 WT y (B) Mec-1 Bcl-xL. Los gráficos muestran el porcentaje de las células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación previa durante 72 horas con metformina (2 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias provenientes de la expansión PBMC7, previamente incubadas durante 1 hora con un anticuerpo anti-Integrina  $\beta 2$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados se muestran como la muerte celular específica. n=1.

Los resultados obtenidos en la *Figura 4.14* muestran que el anticuerpo anti-Integrina  $\beta 2$  no bloquea la muerte inducida por los eCTL sobre Mec-1 WT, ni la susceptibilización inducida por la metformina (*Figura 4.14A*). Por otra parte, el bloqueo con el anticuerpo anti-Integrina  $\beta 2$  en las células Mec-1 Bcl-xL elimina totalmente la susceptibilización a los eCTL inducida por la metformina sin afectar a la citotoxicidad basal (*Figura 4.14B*). En el caso de las eNK, el bloqueo de LFA-1 reduce la susceptibilización inducida por la metformina sobre Mec-1 WT, y elimina totalmente la susceptibilización sobre las células Mec-1 Bcl-xL, aunque también afecta parcialmente a la citotoxicidad basal en este caso (*Figura 4.14B*).

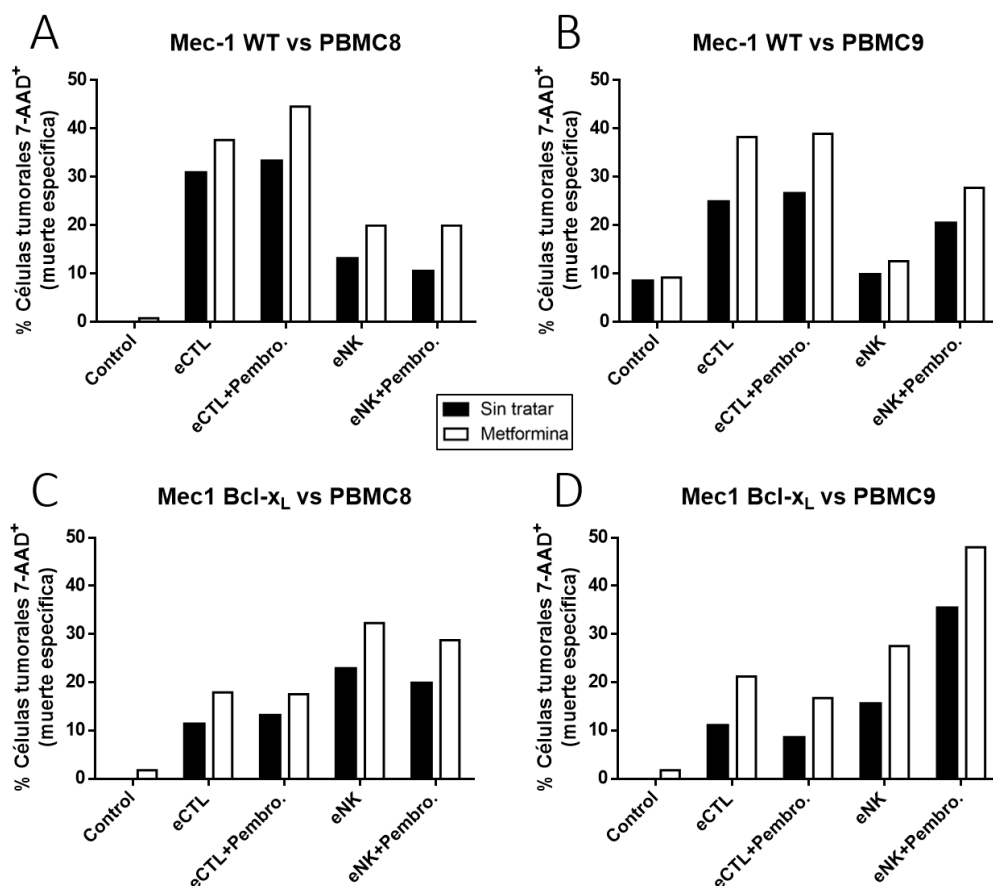
Otros receptores de superficie cuyas expresiones aumentaron en las células Mec-1 WT tras incubación con metformina fueron MICA/B y ULBP-1 (*Figura 4.7A*), ambos reconocidos por el ligando NKG2D presente en las células NK. Para analizar la contribución de este ligando en la sensibilización y la citotoxicidad observada, se empleó un constructo de NKG2D-Fc comercial (R&D Systems), que bloquea los receptores de dicho ligando en las células tumorales. Las células Mec-1 WT, tras haber sido tratadas con metformina durante 72 horas, se incubaron en presencia de este bloqueante, a unas concentraciones de 6.25-25  $\mu\text{g/ml}$ , durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se enfrentaron a las células eNK procedentes de los UCB-MC en las mismas condiciones que el resto de experimentos y se analizó la muerte celular por citometría de flujo.



**Figura 4.15.** Contribución de la interacción NKG2D con sus receptores en la citotoxicidad inducida por las células eNK. Los gráficos muestran el porcentaje de las células Mec-1 WT 7-AAD positivas, tras incubación durante 72 horas con metformina (2 mM), posteriormente con el constructo bloqueante NKG2D-Fc (1 hora) y enfrentadas finalmente, durante 16 horas, a células eNK a un ratio de 1:1 (e:t). Los resultados se muestran como muerte celular específica. n=1.

Los resultados obtenidos demuestran, sin embargo, que el bloqueo de la interacción de NKG2D con sus receptores no impide la inducción de citotoxicidad de las células eNK sobre las células Mec-1 WT, ni la susceptibilización por parte de la metformina (*Figura 4.15*).

Por último, otra interacción que se quiso evaluar fue la del ligando de inhibición PD-L1 con su receptor PD-1 de la célula efectora. Para llevar esto a cabo, se empleó el anticuerpo bloqueante anti-PD-1 pembrolizumab (MSD), amablemente cedido por el Dr. Roberto Pazo (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza). Los eCTL y las células eNK se incubaron previamente al ensayo de citotoxicidad durante 30 minutos con pembrolizumab (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y, seguidamente, se sembraron sobre las células tumorales hasta el día siguiente, cuando se evaluó la muerte celular inducida en los tumores.



**Figura 4.16.** Contribución de la interacción PD-1-PD-L1 en la citotoxicidad inducida por los eCTL y células eNK en las líneas celulares: (A) (B) Mec-1 WT y (C) (D) Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>. Los gráficos muestran el porcentaje de las células tumorales 7-AAD<sup>+</sup> tras incubación previa durante 72 horas con metformina (2 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias provenientes de las expansiones: (A) (C) PBMC8 y (B) (D) PBMC9, previamente incubadas durante 1 hora con un anticuerpo anti-PD-1 (10 µg/ml). Los resultados se muestran como la muerte celular específica. n=1.

En este ensayo, se emplearon eCTL y células eNK provenientes de dos expansiones distintas (PBMC8 y 9) contra las líneas celulares de B-CLL Mec-1 WT y Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> sin tratar o pre-tratadas con metformina.

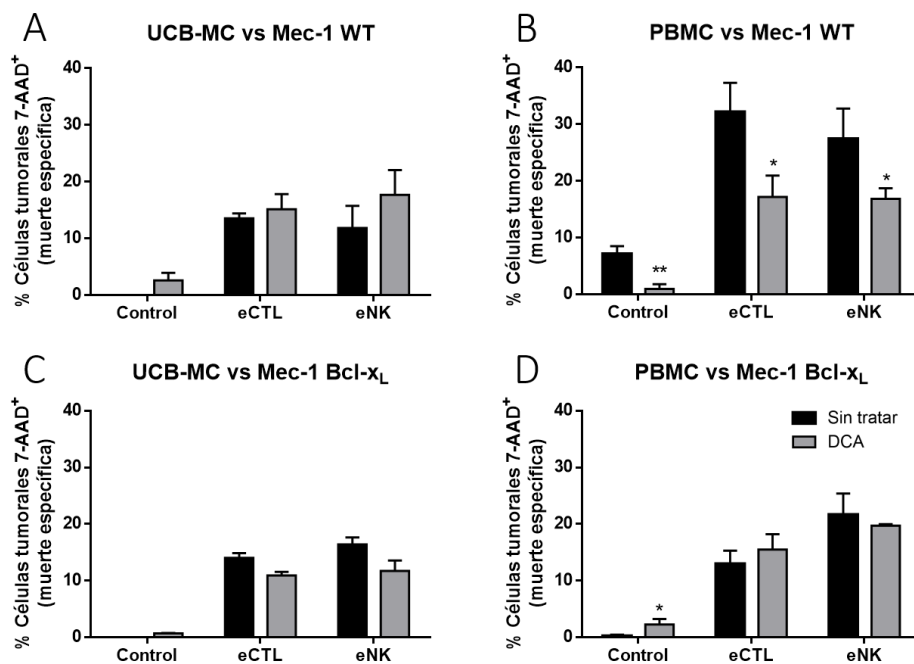
Para apreciar mejor los resultados obtenidos, se decidió representar los datos de cada expansión y de cada línea celular tumoral por separado (Figura 4.16). Se puede observar que el bloqueo de PD-1 fue efectivo para aumentar el efecto citotóxico de las células eNK de la expansión PBMC9 sobre las células Mec-1 WT tratadas y sin tratar con metformina (Figura 4.16B), siendo este efecto especialmente visible sobre las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> (Figura 4.16D). Esta tendencia, sin embargo, no puede observarse en las células eNK del donante 8 contra ninguno de los dos tumores (Figura 4.16A,C). Respecto a los eCTL, mientras que no se observa prácticamente efecto de pembrolizumab sobre la muerte celular en las derivadas del PBMC9 (Figura 4.16B,D), sí se puede detectar un aumento en las del donante 8 contra las células Mec-1 WT, siendo algo más evidente cuando han sido pre-tratadas con metformina (Figura 4.16A).

#### **4.1.3 Efecto del DCA sobre la sensibilización de los tumores a la acción citotóxica de los eCTL y células eNK**

Otro fármaco metabólico que puede afectar a la citotoxicidad de células NK y CTL es el dicloroacetato (DCA), que mediante la activación de la vía OXPHOS, induce, por ejemplo, el aumento en la expresión del HLA-I (Catalán et al., 2015; Charni et al., 2010). Este fármaco ha sido ampliamente empleado en la clínica como tratamiento para la acidosis láctica. En este estudio, se ha trabajado con el DCA a una concentración de 5 mM. Se escogió esta dosis por no ejercer efectos adversos en clínica (James & Stacpoole, 2016) y porque no induce muerte celular por sí sola en las líneas celulares utilizadas.

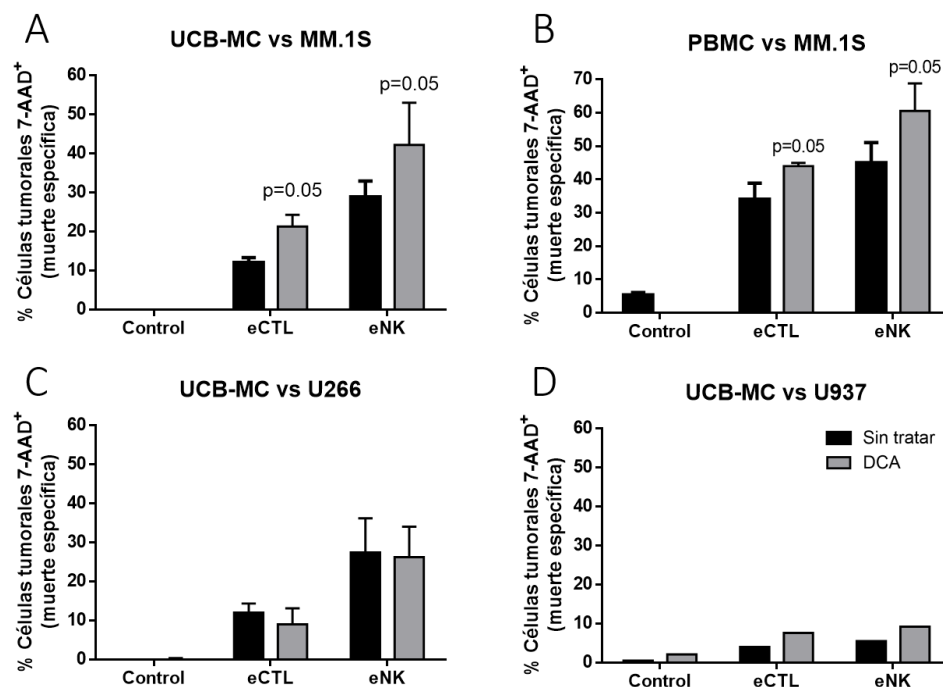
##### ***4.1.3.1 Capacidad citotóxica de los eCTL y las células eNK provenientes de UCB y PBMC sobre los tumores pre-tratados con DCA***

Las células tumorales fueron previamente tratadas con DCA. Para ello, se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml en presencia o ausencia de DCA (5 mM) durante 72 horas. Después del marcaje con la sonda fluorescente, los eCTL o las células eNK se sembraron sobre las células tumorales (sin tratar o tratadas con DCA) en relación 1:1 (célula diana:célula efectora) y se dejaron incubar durante toda la noche. Al día siguiente, las células fueron marcadas con 7-AAD y se evaluó la muerte celular de las células tumorales mediante citometría de flujo.



**Figura 4.17.** Sensibilidad de las líneas celulares tumorales tratadas con DCA a la acción citotóxica de los eCTL o las células eNK (parte I). Los gráficos muestran el porcentaje de células tumorales 7-AAD<sup>+</sup> tras incubación durante 72 horas con DCA (5 mM) y enfrentadas posteriormente a eCTL o eNK provenientes de (A),(C) UCB-MC o (B),(D) PBMC durante 16 horas a un ratio de 1:1 (e:t), expresado como muerte celular específica. Las líneas celulares tumorales empleadas son las líneas de B-CLL (A),(B) Mec-1 WT y (C),(D) Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de al menos 2 experimentos diferentes. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

Como se ha mostrado previamente, tanto los eCTL como las eNK inducen un nivel de citotoxicidad de alrededor del 20% tanto sobre las células Mec-1 WT como sobre las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> (Figura 4.17). Este nivel de citotoxicidad aumenta hasta el 40% en el caso de los eCTL o eNK derivados de PBMC (Figura 4.17B), pero, en este caso, la sobreexpresión de Bcl-x<sub>L</sub> reduce esta citotoxicidad hasta el 20% (Figura 4.17D). Respecto al tratamiento con DCA, este fármaco no indujo un efecto sensibilizador a la acción de eCTL o de eNK. Antes al contrario, el tratamiento con DCA redujo significativamente la citotoxicidad de eCTL o de eNK derivadas de PBMC sobre las células Mec-1 WT (Figura 4.17B).

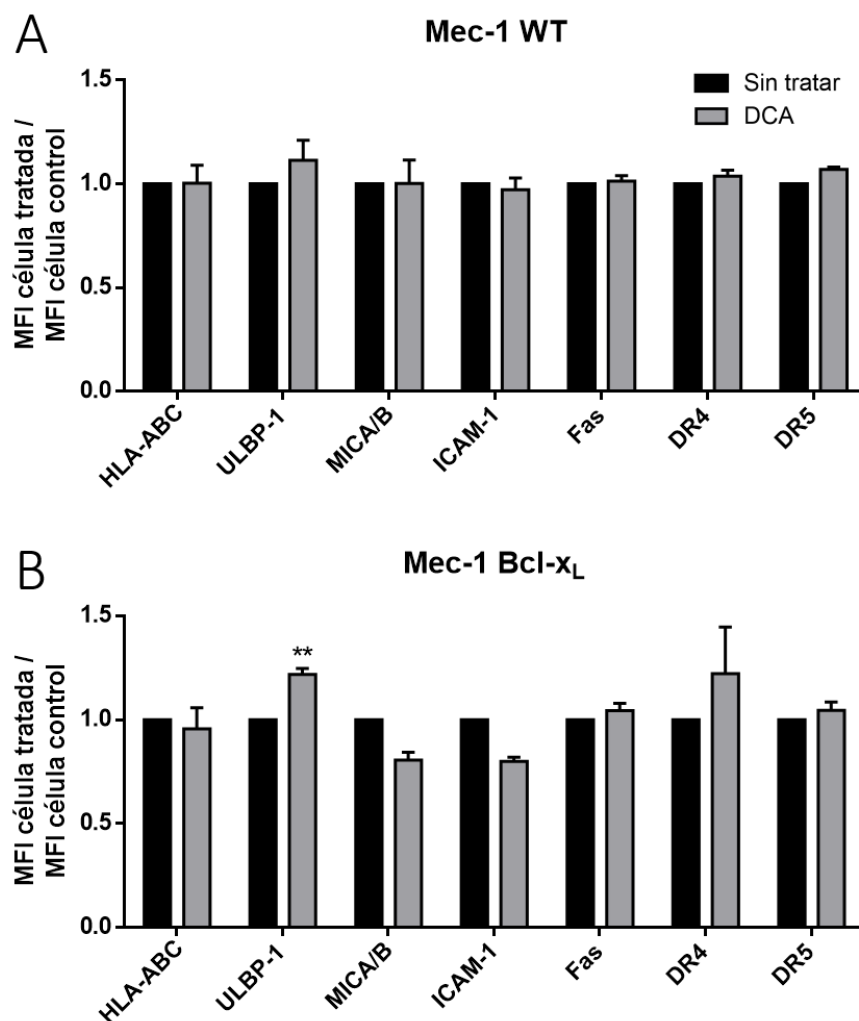


**Figura 4.18.** Sensibilidad de las líneas celulares tumorales tratadas con DCA a la acción citotóxica de los eCTL o las células eNK (parte II). Los gráficos muestran el porcentaje de células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación durante 72 horas con DCA (5 mM) y enfrentadas posteriormente a eCTL o eNK provenientes de (A),(C),(D) UCB-MC o (B) PBMC durante 16 horas a un ratio de 1:1 (e:t), expresado como muerte celular específica. Las líneas celulares tumorales empleadas son: las líneas de mieloma múltiple (A),(B) MM.1S y (C) U266; y la línea de linfoma histiocítico (D) U937L. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD al menos 2 experimentos (A-C), siendo n=1 para (D).

Esta terapia combinada también se evaluó en la línea celular de mieloma múltiple MM.1S, donde, tanto para los eCTL y células eNK provenientes de UCB-MC como de PBMC, el DCA sí que ejerció un efecto sensibilizador (*Figura 4.18*). No fue así para la línea celular de mieloma múltiple U266, donde el DCA no influyó sobre la citotoxicidad inducida por eCTL o eNK derivadas de UCB-MC (*Figura 4.18C*). Además de esto, en la línea celular de linfoma histiocítico U937 no se observó apenas citotoxicidad bajo ninguna condición (*Figura 4.18D*).

#### 4.1.3.2 Efecto del DCA sobre la expresión de proteínas en los tumores ensayados

Como primera aproximación para comprender los resultados obtenidos en el apartado anterior, se quiso evaluar por citometría de flujo el posible efecto del DCA sobre la expresión de varias proteínas de superficie que participan en la citotoxicidad de los eCTL y células eNK: HLA-ABC, ULBP-1, MICA/B, ICAM-1, Fas, DR4 y DR5.

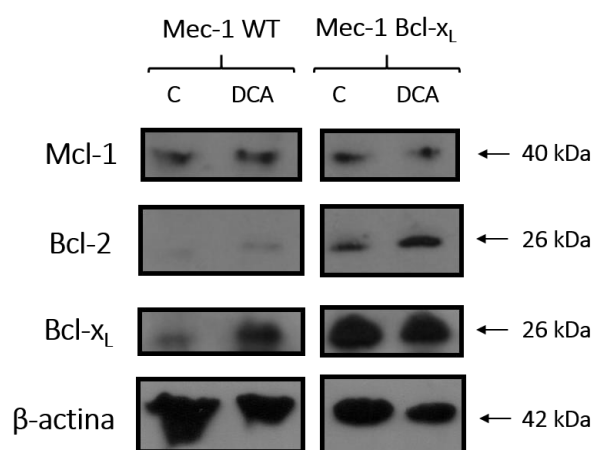


**Figura 4.19.** Expresión de los receptores de superficie HLA-ABC, ULBP-1, MICA/B, ICAM1, Fas, DR4 y DR5 tras incubación durante 72 horas con DCA (5 mM) en las líneas celulares de B-CLL: (A) Mec-1 WT y (B) Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>. Los datos se presentan como la variación normalizada relativa de la expresión de las células tratadas respecto a las células sin tratar. Los resultados son la media  $\pm$  SD de  $n \geq 3$ . \*\* $p < 0.01$

Comenzando por las líneas celulares de B-CLL, el tratamiento con DCA no alteró prácticamente la expresión de ninguno de los receptores medidos (*Figura 4.19*), concordando con la falta de sensibilización a la muerte inducida por las células inmunitarias en estas células (*Figura 4.17*).



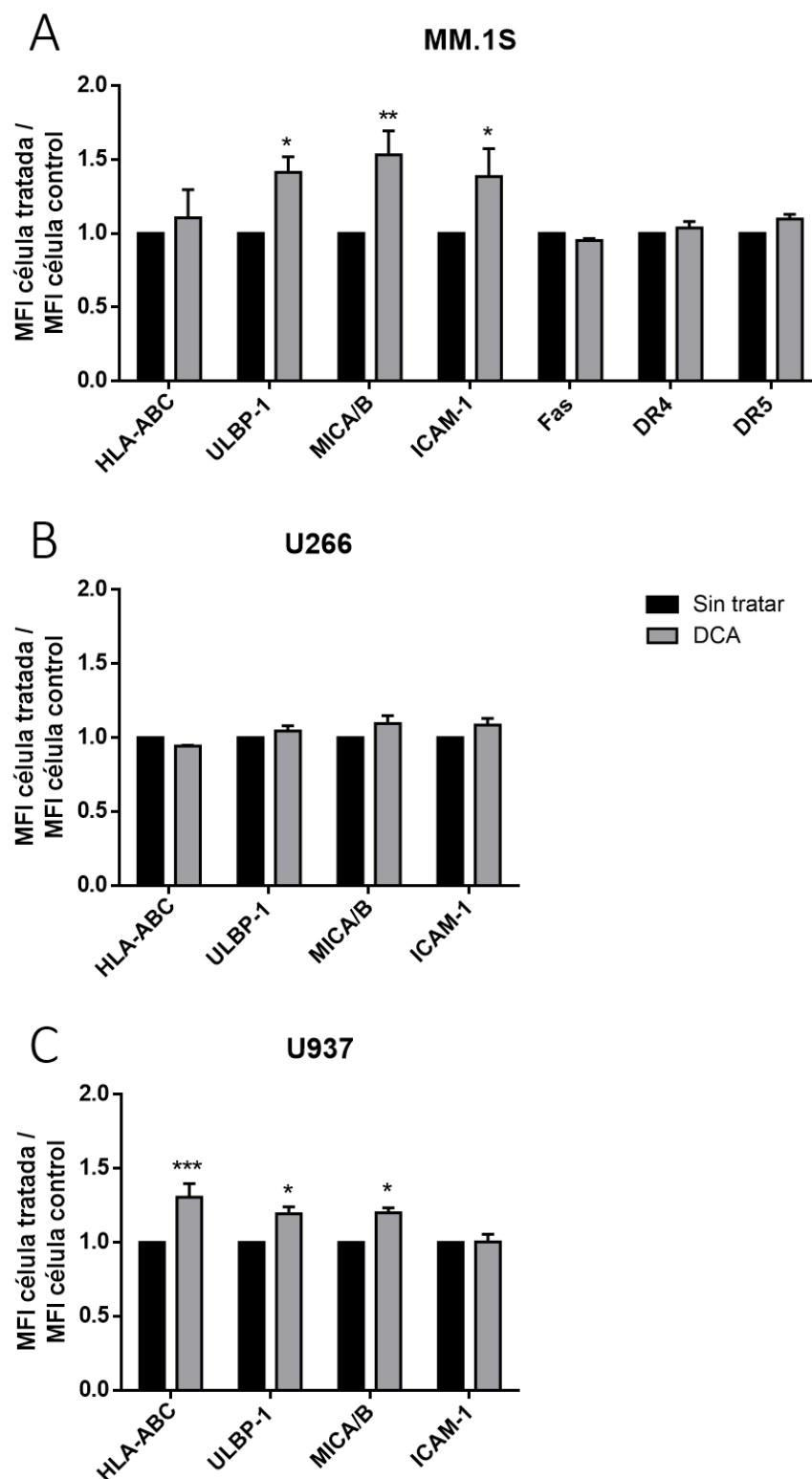
Además del análisis de varias proteínas de superficie implicadas en la respuesta inmunitaria, se quiso comprobar para el caso de las células Mec-1 WT y Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> la expresión de varias proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2: Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>. Las células ensayadas se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml y se incubaron con DCA (5 mM) durante 72 horas. Seguidamente, se obtuvieron extractos celulares de ellas y las proteínas se separaron por electroforesis para su posterior análisis por Western-Blot:



**Figura 4.20.** Niveles de expresión de las proteínas Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> en las líneas celulares Mec-1 WT y Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>. Las líneas celulares se cultivaron a una densidad de  $3 \times 10^5$  cél/ml en presencia o ausencia ("C") de DCA (5 mM) durante 72 horas y se recogieron un mínimo de  $3 \times 10^6$  células para la obtención de extractos celulares. Las proteínas de interés en estos extractos se analizaron por Western-Blot.

Los resultados obtenidos indican un aumento en la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> en las células Mec-1 WT, y de Bcl-2 en las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> tras incubación con DCA, mientras que la expresión de Mcl-1 no parece variar (*Figura 4.20*).

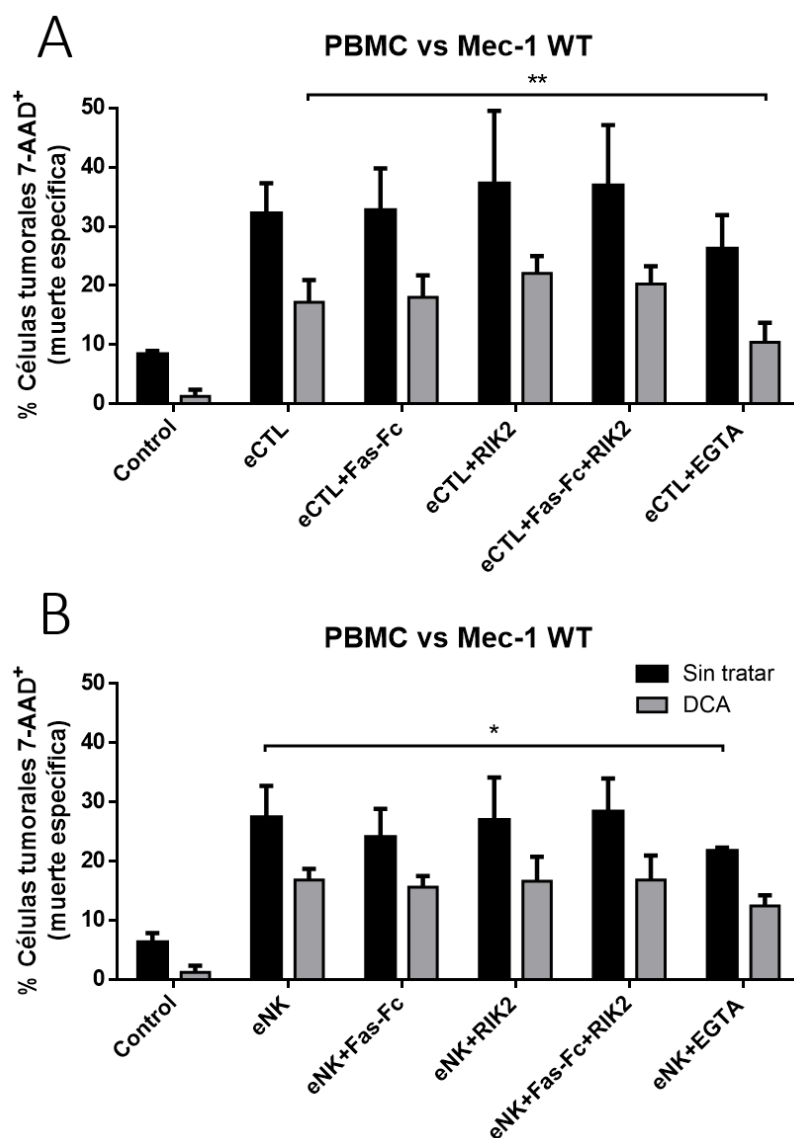
Finalmente, se analizó la expresión en superficie de varias proteínas en las líneas celulares de mieloma múltiple MM.1S y U266 y en la línea de linfoma histiocítico U937 (*Figura 4.21*). En el caso de las células U266 y U937, se decidió no analizar la expresión de los receptores ya que no se habían obtenido efectos del DCA sobre la citotoxicidad de eCTL o de eNK (ver *Figura 4.17*). En las células MM.1S, el DCA indujo incrementos significativos en la expresión de MICA/B, ULBP-1 e ICAM-1 (*Figura 4.21A*). Para las células U266, no pudo detectarse ninguna variación significativa de los receptores medidos (*Figura 4.21B*). Respecto a las células U937, sí pudo observarse una inducción de la expresión de HLA-ABC, ULBP-1 y MICA/B tras incubarlas con DCA (*Figura 4.21C*).



**Figura 4.21.** Expresión de los receptores de superficie HLA-ABC, ULBP-1, MICA/B, ICAM1, Fas, DR4 y DR5 tras incubación durante 72 horas con DCA (5 mM) en las líneas celulares de mieloma múltiple: (A) MM.1S y (B) U266; y en (C) la línea celular de linfoma histiocítico U937. Los datos se presentan como la variación normalizada relativa de la expresión de las células tratadas respecto a las células sin tratar. Los resultados son la media  $\pm$  SD de  $n \geq 3$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 4.1.3.3 Estudio de los mecanismos de sensibilización a los eCTL y eNK por parte del DCA

Para ello, se volvieron a realizar los ensayos de citotoxicidad sobre estas células tumorales, empleando anticuerpos, constructos o reactivos bloqueantes de las interacciones entre la célula efectora y la célula diana.

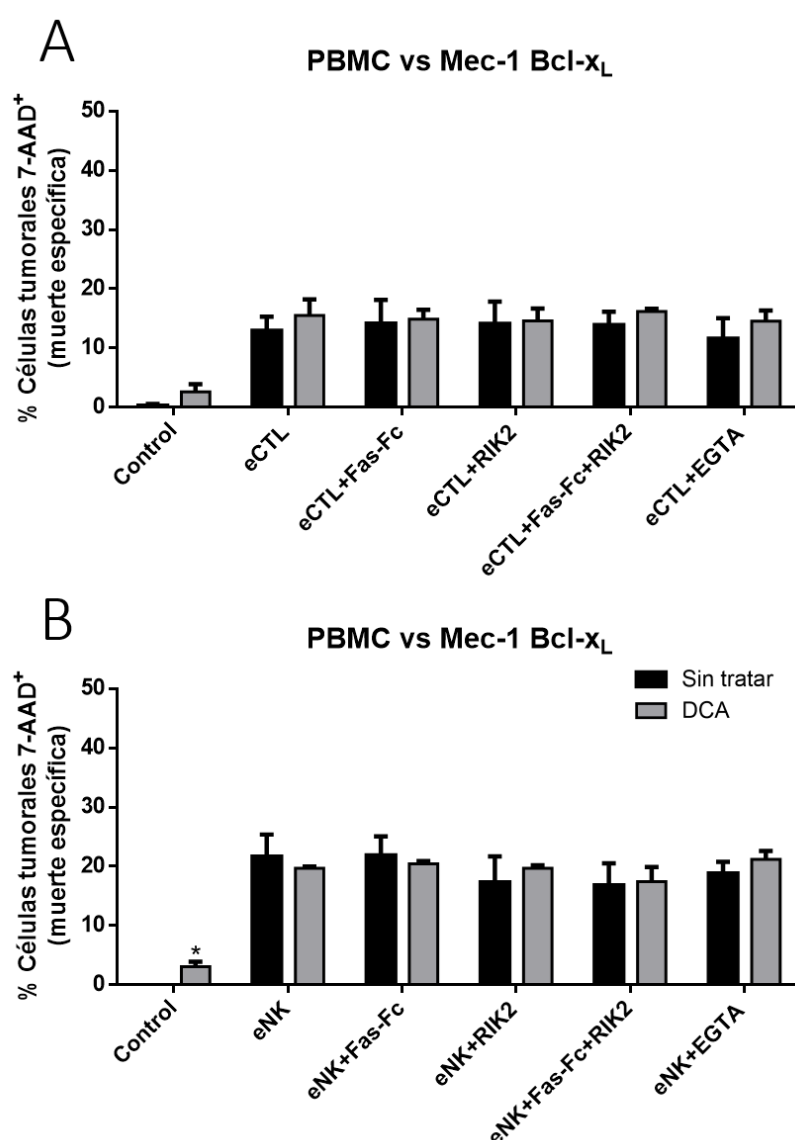


**Figura 4.22.** Contribución de las interacciones Fas-FasL y TRAIL-DR4/DR5 y de la exocitosis granular en la citotoxicidad inducida, en las células Mec-1 WT, por los (A) eCTL y (B) las células eNK. Los gráficos muestran el porcentaje de las células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación previa durante 72 horas con DCA (5 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias previamente incubadas durante 1 hora con EGTA (1 mM, quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ ), Fas-Fc (10 ng/ml, bloqueante de Fas-L) y/o RIK2 (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , bloqueante de TRAIL). Los resultados se muestran como la media de la muerte celular específica  $\pm$  SD de  $n=3$ . \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ .

Para comenzar, se analizó la contribución de la interacción de los ligandos mortales FasL y TRAIL con sus receptores (Fas y DR4/DR5), así como del mecanismo de degranulación, en la citotoxicidad inducida por los eCTL o eNK sobre los tumores tratados o sin tratar con DCA. Para ello, se emplearon los siguientes compuestos: el constructo humanizado Fas-Fc, bloqueante de FasL (10 ng/ml); el anticuerpo monoclonal RIK2, bloqueante de TRAIL (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); y el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA (1 mM), que bloquea la degranulación, evitando así la activación del mecanismo

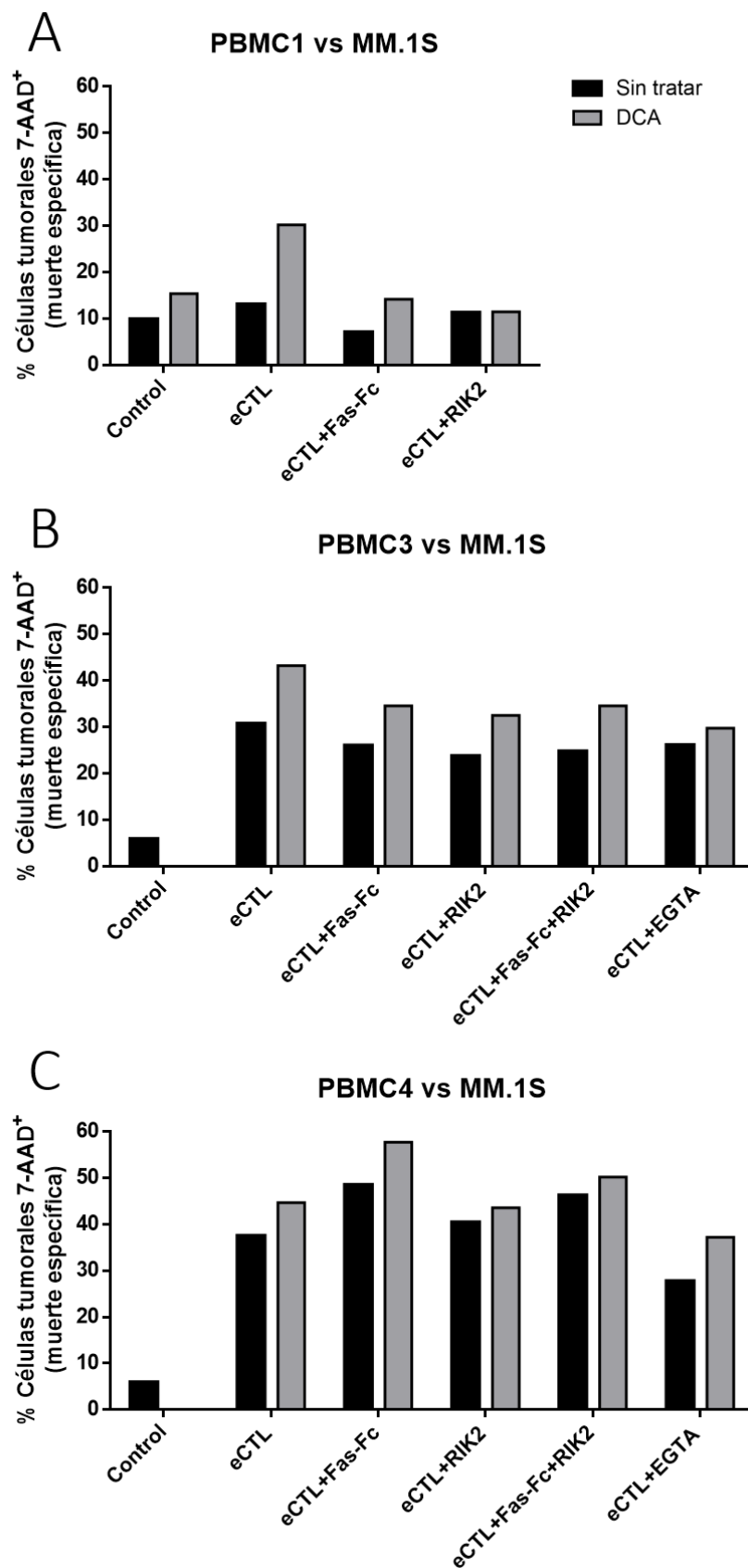
mediado por perforina y granzimas. Los eCTL y las células eNK, una vez aisladas y marcadas con la sonda fluorescente, se incubaron con estos compuestos durante una hora antes de sembrarlas sobre los tumores para los ensayos de citotoxicidad.

Estos ensayos confirmaron la inhibición en la citotoxicidad de eCTL o eNK sobre las células Mec-1 WT por parte del DCA en todas las condiciones experimentales ensayadas. Por otra parte, en estos ensayos, el bloqueo de los ligandos mortales no varió la citotoxicidad observada sobre el tumor, tratado o sin tratar, mostrando así la falta de contribución de estas interacciones en la muerte inducida por los eCTL y las células eNK. El bloqueo del sistema perforina-granzima sí produjo una disminución de la citotoxicidad sobre ambas células inmunitarias (*Figura 4.22*).



**Figura 4.23.** Contribución de las interacciones Fas-FasL y TRAIL-DR4/DR5 y de la exocitosis granular en la citotoxicidad inducida, en las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, por los (A) eCTL y (B) las células eNK. Los gráficos muestran el porcentaje de las células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación previa durante 72 horas con DCA (5 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias previamente incubadas durante 1 hora con EGTA (1 mM, quelante de Ca<sup>2+</sup>), Fas-Fc (10 ng/ml, bloqueante de Fas-L) y/o RIK2 (2.5 µg/ml, bloqueante de TRAIL). Los resultados se muestran como la media de la muerte celular específica ± SD de n=3. \*p<0.05.

También se realizaron estos mismos bloqueos para las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>. Como puede apreciarse en la *Figura 4.23*, ninguno de los bloqueos de los ligandos mortales con sus receptores ni la inhibición de la degranulación citotóxica surtieron efecto sobre la ya reducida muerte celular

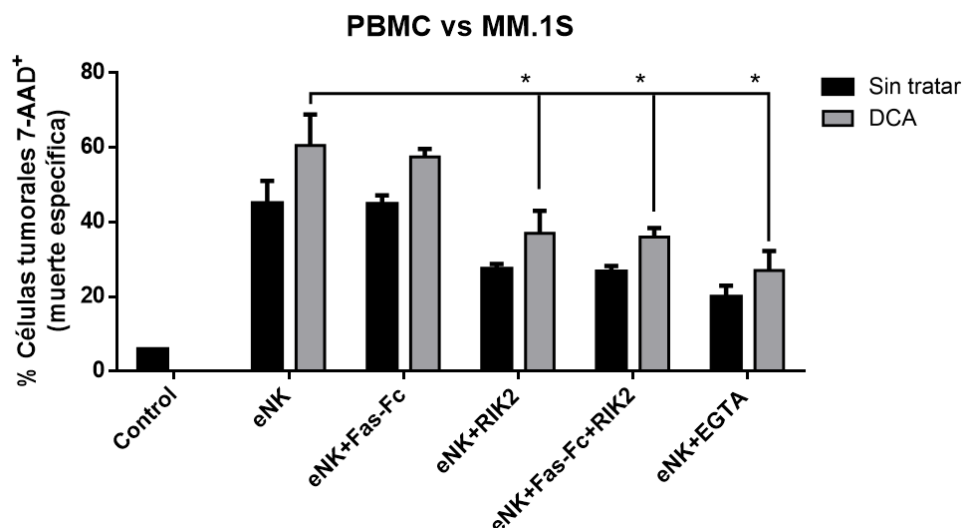


**Figura 4.24.** Contribución de las interacciones Fas-FasL y TRAIL-DR4/DR5 y de la exocitosis granular en la citotoxicidad inducida, en las células MM.1S por los eCTL obtenidos de las expansiones (A) PBMC1; (B) PBMC3 y (C) PBMC4. Los gráficos muestran el porcentaje de las células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación previa durante 72 horas con DCA (5 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias previamente incubadas durante 1 hora con EGTA (1 mM, quelante de  $Ca^{2+}$ ), Fas-Fc (10 ng/ml, bloqueante de Fas-L) y/o RIK2 (2.5  $\mu$ g/ml, bloqueante de TRAIL). Los resultados se muestran como la muerte celular específica. n=1.

inducida por tanto los eCTL como las células eNK sobre estas células tumorales especialmente resistentes a la apoptosis.

Finalmente, se analizó la participación de las interacciones Fas-FasL, TRAIL-DR4/DR5 y la degranulación en la muerte celular observada en la línea celular de mieloma múltiple MM.1S. Dado los resultados obtenidos, la acción citotóxica de los eCTL se muestra para cada uno de los PBMC usados por separado (*Figura 4.24*), mientras que la de las células eNK se muestra como la media  $\pm$  SD de los diferentes donantes (*Figura 4.25*).

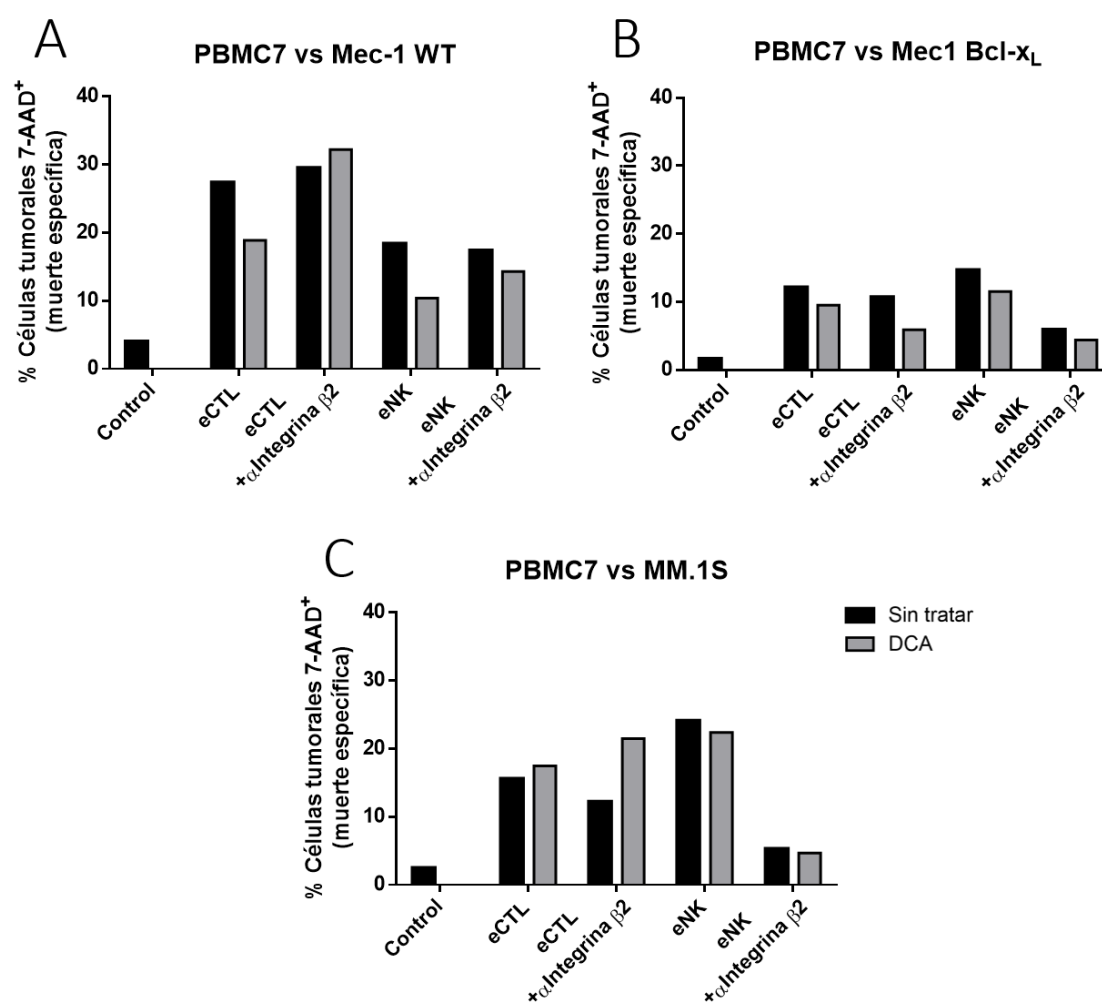
Para todos los PBMC utilizados sobre las células MM.1S, se puede apreciar la susceptibilización inducida por el DCA en las células tumorales a la acción citotóxica de los eCTL (*Figura 4.24*). Para los eCTL provenientes de la expansión PBMC1, éstos apenas indujeron muerte celular en las células sin tratar, y el bloqueo tanto de FasL como de TRAIL eliminó por completo la susceptibilización inducida por el DCA (*Figura 4.24A*). En el caso de la expansión PBMC3, también se redujo, aunque sólo de forma parcial, la citotoxicidad de los eCTL al bloquear los ligandos mortales FasL y TRAIL como la degranulación (*Figura 4.24B*). No obstante, estos bloqueos no surtieron efecto sobre los eCTL provenientes de la expansión PBMC4, donde sólo se puede apreciar una disminución de la muerte celular al incubarse con EGTA (*Figura 4.24C*). De esta forma, parece que la acción de los eCTL sobre las células MM.1S pre-incubadas con DCA depende en gran medida del donante.



**Figura 4.25.** Contribución de las interacciones Fas-FasL y TRAIL-DR4/DR5 y de la exocitosis granular en la citotoxicidad inducida, en las células MM.1S por las células eNK. La figura muestra el porcentaje de las células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación previa durante 72 horas con DCA (5 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias previamente incubadas durante 1 hora con EGTA (1 mM, quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ ), Fas-Fc (10 ng/ml, bloqueante de Fas-L) y/o RIK2 (2.5  $\mu\text{g/ml}$ , bloqueante de TRAIL). Los resultados se muestran como la media de la muerte celular específica  $\pm$  SD de  $n=3$ . \* $p<0.05$ .

Respecto a las células eNK, se puede observar una clara disminución de la susceptibilización inducida por DCA por parte de RIK2 o EGTA (*Figura 4.25*), demostrando así una contribución importante de la interacción TRAIL-DR4/DR5 y del sistema perforina-granzima en este proceso. La reducción se observa también en cierta medida en las células sin tratar con DCA.

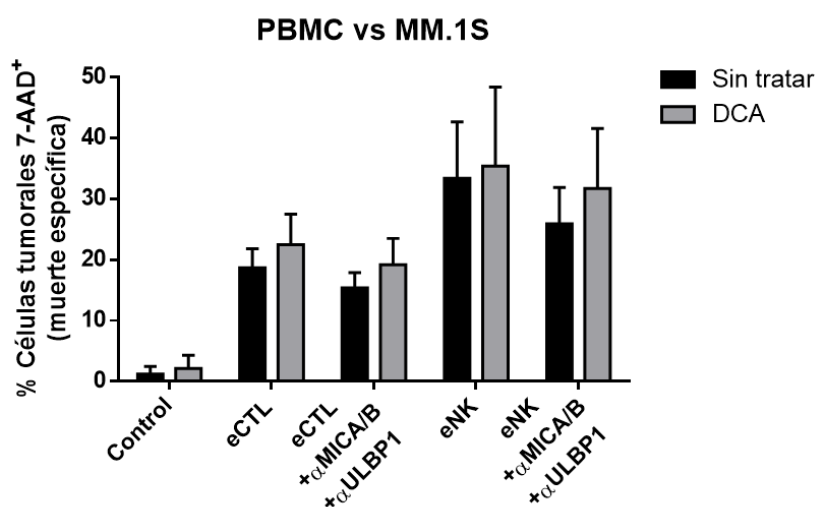
Otro de los receptores de superficie medidos que podría jugar un papel importante en el mecanismo de citotoxicidad de los eCTL y las células eNK es ICAM-1. Por consiguiente, se analizó la contribución de la interacción ICAM-1 con LFA-1 en la citotoxicidad inducida por las células inmunitarias derivadas de PBMC. Para este experimento, se utilizó un anticuerpo anti-Integrina  $\beta_2$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ), bloqueante de LFA-1.



**Figura 4.26.** Contribución de la interacción ICAM-1-LFA-1 en la citotoxicidad inducida por los eCTL y células eNK en las líneas celulares: (A) Mec-1 WT; (B) Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>; y (C) MM.1S. Los gráficos muestran el porcentaje de las células tumorales 7-AAD positivas, tras incubación previa durante 72 horas con DCA (5 mM) y enfrentadas, a un ratio de 1:1 (e:t) y durante 16 horas, a las células inmunitarias provenientes de la expansión PBMC7, previamente incubadas durante 1 hora con un anticuerpo anti-Integrina  $\beta_2$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados se muestran como la muerte celular específica. n=1.

En la *Figura 4.26* se recoge el efecto de este anticuerpo bloqueante sobre las células sin tratar o tratadas con DCA. Se puede apreciar que la acción de este anticuerpo varió en función de la línea celular y del tipo de célula inmunitaria empleada. En las células Mec-1 WT, no se pudo observar ninguna disminución de la muerte celular inducidas por eCTL o eNK (*Figura 4.26A*). Sin embargo, sí hubo una reducción parcial de la citotoxicidad al bloquear LFA-1 en los eCTL y, especialmente, en las células eNK de este donante contra las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> (*Figura 4.26B*). Para el caso de las células MM.1S, mientras que apenas se observó un efecto en los eCTL, el bloqueo de la interacción ICAM-1-LFA-1 inhibió casi por completo la citotoxicidad de las células eNK (*Figura 4.26C*).

Por último, los receptores de superficie MICA/B y ULBP-1 eran otros cuya expresión incrementaba tras incubación con DCA en las células MM.1S (*Figura 4.21*). Es por ello que se quiso averiguar la relevancia de estos receptores en esta línea celular empleando PBMC. Para este caso, se utilizaron anticuerpos específicos de MICA/B y ULBP-1 (10 µg/ml, R&D Systems), que se incubaron durante una hora con las células tumorales para bloquear su interacción con el ligando NKG2D de los eCTL y las células eNK. Posteriormente, se enfrentaron dichas células tumorales a las células inmunitarias en un ratio 1:1 y se analizaron los resultados al día siguiente.



**Figura 4.27.** Contribución de la interacción NKG2D con los receptores MICA/B y ULBP-1 en la citotoxicidad inducida por los eCTL y las células eNK. Los gráficos muestran el porcentaje de las células MM.1S 7-AAD positivas, tras incubación durante 72 horas con DCA (2 mM), posteriormente con los anticuerpos anti-MICA/B y anti-ULBP-1 (10 µg/ml, 1 hora) y enfrentadas finalmente, durante 16 horas, a células eNK a un ratio de 1:1 (e:t). Los resultados se muestran como la media de la muerte celular específica ± SD de n=2.

A pesar de que los bloqueos no llegaron a ser estadísticamente significativos, los resultados obtenidos muestran una cierta tendencia a la disminución de la susceptibilización inducida por el DCA sobre las células MM.1S en el caso de los eCTL (*Figura 4.27*).



#### 4.1.4 Discusión sobre la capacidad citotóxica de los eCTL y células eNK sobre tumores hematológicos pre-tratados con DCA o metformina

En aquellos tumores detectados por el SI (tumores inmunogénicos), el papel de las células inmunitarias del organismo es crucial para el devenir del desarrollo tumoral. En caso de no poder eliminarlo, su acción es contraproducente, dado que empuja al tumor a desarrollar mecanismos de resistencia que conllevan eventualmente al fallo del SI para combatirlo (Dunn et al., 2002).

La terapia celular adoptiva es un tipo de inmunoterapia que surge del intento de mejorar la acción de las células efectoras inmunitarias para atacar al tumor de forma más eficiente (ver *Apartado 1.4.5*). En este trabajo, se han desarrollado dos protocolos de expansión de CTL's y células NK *in vitro*, parecidos entre sí, pero utilizando dos materiales de partida distintos: sangre de cordón umbilical (UCB) y sangre periférica de donantes sanos adultos. Los protocolos de expansión empleados lograron aumentar el número de células totales tanto para los UCB-MC (*Figura 4.1A*) como para los PBMC (*Figura 4.1B*). Respecto a la proporción de células CD3<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup> en cultivo, tanto para UCB-MC como para PBMC, parece que la expansión de una u otra población es dependiente del donante (*Figura 4.2 y Figura 4.3*). Otros protocolos de expansión en terapia celular adoptiva separan ambos tipos celulares al comienzo de la incubación, con el objetivo de que la expansión de una población no interfiera en la otra, o simplemente por el interés en un solo tipo celular (Gros et al., 2014; Sánchez-Martínez et al., 2018). En este caso, ambos tipos celulares pudieron ser co-cultivados sin eliminar previamente ninguna de las dos poblaciones. Si bien es cierto que, en el transcurso de las semanas, una población terminaba superando a la otra, tanto las células CD3<sup>+</sup> como las CD56<sup>+</sup> se expandieron. El ratio de expansión obtenido sería suficiente para poder tratar a un paciente de neoplasia hematológica con las células alogénicas procedentes de un solo donante. Hasta ahora, estas terapias se han llevado a cabo mezclando células de varios donantes (Nguyen et al., 2011), aunque últimamente las terapias basadas en CAR usan células del propio paciente (Porter et al., 2011).

Los eCTL y las células eNK expandidas a partir tanto de UCB-MC como de PBMC han demostrado ser capaces de inducir citotoxicidad las células tumorales ensayadas (*Figura 4.5 y Figura 4.6*), salvo en la línea celular de linfoma histiocítico U937 (*Figura 4.6D*). Esto puede correlacionarse con la baja expresión de todos los receptores de superficie analizados en estas células (datos no mostrados). En el caso de las células de B-CLL, tanto los eCTL como las eNK procedentes de UCB-MC indujeron un nivel similar de muerte sobre las células Mec-1 WT o sobre las células que sobreexpresan Bcl-x<sub>L</sub>, aunque el nivel de citotoxicidad es bajo (*Figura 4.5A,C*). En el caso de las células procedentes de PBMC, la citotoxicidad es mayor sobre las células Mec-1 WT,

pero ésta se reduce sobre las células que sobreexpresan Bcl-x<sub>L</sub> (*Figura 4.5B,D*). De hecho, uno de los mecanismos de resistencia de los tumores de B-CLL es la sobreexpresión de varios miembros de la familia de Bcl-2, entre ellos Bcl-x<sub>L</sub> (Ruefli-Brasse & Reed, 2017).

Visto el efecto de estos eCTL y células eNK de ambos tipos de expansión sobre los tumores ensayados, sería también interesante en un futuro ensayar la capacidad citotóxica de estas células sobre otros tipos de tumores hematológicos, tales como el linfoma de células B o la gammapatía monoclonal de significado incierto, ambas neoplasias comunes dentro de los cánceres de origen hematológico (Smith, Howell, Patmore, Jack, & Roman, 2011). Asimismo, gracias a la colaboración de nuestro grupo con los Dres. Luis Palomera y Gemma Azaceta (Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza), se podría evaluar el tratamiento con estos eCTL y células eNK expandidos directamente sobre muestras de pacientes de B-CLL y mieloma múltiple, para así poder analizar con mayor precisión la posible validez de esta terapia en la clínica. Bajo esa circunstancia, habría que comprobar la alogenicidad de las células eNK empleadas, así como el uso de eCTL que fueran capaces de reconocer al tumor del paciente.

Además de tratar de mejorar la capacidad citotóxica de las células efectoras, con el objetivo de mejorar este tipo de terapia, se propuso también modificar el flanco del tumor, para que éstos fueran además más sensibles al tratamiento. Para ello, se propuso la utilización de fármacos metabólico que alteran el metabolismo energético. Una de las características biológicas principales de los tumores es el cambio que sufren en la forma de obtener energía (Hanahan & Weinberg, 2011), pasando de obtener preferentemente la energía a través de la vía OXPHOS a la fermentación láctica, aun en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como *efecto Warburg* (Warburg, 1956a). Este cambio no sólo les confiere una ventaja adaptativa en el TME, sino que además se produce una remodelación de las vías de señalización intracelulares, así como de la mitocondria, que favorecen su crecimiento y resistencia a la muerte celular (ver *Apartado 1.2*). Por tanto, el uso de fármacos que alteren este metabolismo energético establecido en los tumores pueden suponer una buena estrategia para revertir dichas ventajas (Villalba et al., 2014). En este trabajo, se escogieron como agentes sensibilizadores de las células tumorales al DCA y a la metformina, como se ha descrito en el *Apartado 2.1*.

#### **4.1.4.1 *Discusión sobre la susceptibilización del DCA en tumores hematológicos a la acción citotóxica de eCTL y células eNK***

El DCA es un fármaco que, al inhibir a la enzima PDK1, revierte el efecto Warburg, forzando la conversión de piruvato en acetil-CoA y la utilización de la vía OXPHOS. Salvo en células

cuya mETC esté dañada, su efecto es más citostático que citotóxico sobre los tumores. Además de esto, se ha observado que el DCA es capaz de aumentar la expresión del MHC-I en los tumores (Catalán et al., 2015; Charni et al., 2010) y de activar a la enzima AMPK, que a su vez puede modificar numerosas vías de señalización celulares (Faubert et al., 2015). Por todo ello, se consideró este fármaco como candidato para ser empleado en la terapia combinada con eCTL y células eNK.

En la *Tabla 4.1* se resumen los efectos combinatorios de este fármaco y su posible mecanismo de susceptibilización en los tumores empleados contra las células inmunitarias. En las células de B-CLL Mec-1, no se observa susceptibilización por parte del DCA ni para las células efectoras de UCB-MC ni para las de PBMC (*Figura 4.17*). De hecho, las células Mec-1 WT se vuelven significativamente más resistentes a los eCTL y células eNK provenientes de los PBMC (*Figura 4.17B*). Este aumento en la resistencia a la muerte celular se correlaciona con un aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> en las células Mec-1 WT tratadas con DCA (*Figura 4.20*). De hecho, el tratamiento con DCA hace bajar la citotoxicidad de eCTL y de eNK procedentes de PBMC a los mismos niveles que los observados en las células Mec-1 que sobreexpresan constitutivamente Bcl-x<sub>L</sub> (*Figura 4.17B,D*), sugiriendo globalmente un papel importante de esta proteína en el mecanismo de resistencia. En consonancia con la falta de susceptibilización observada, el DCA tampoco fue capaz de modular la expresión de los receptores de superficie medidos en estas células (*Figura 4.19*). A pesar de todo ello, en los bloqueos realizados con las células inmunitarias de los PBMC puede verse la influencia del sistema perforina-granzima en la citotoxicidad en estas células sobre las Mec-1 WT tanto tratadas como no tratadas con DCA (*Figura 4.22*).

El DCA, al forzar el uso de la vía OXPHOS, modifica la forma de obtener ATP en las células tumorales, alterando así el ratio AMP/ATP. Esta variación en el balance AMP/ATP permite la activación de la enzima AMPK, la cual es capaz de actuar sobre múltiples vías de señalización (Faubert et al., 2015). Una de sus principales dianas es la proteína supresora de tumores p53 (Jones et al., 2005). Esta proteína es conocida, entre otras razones, por estar habitualmente mutada en los tumores, bloqueando el control en el ciclo celular y permitiéndoles así un crecimiento acelerado (Morris & Chan, 2015). Se ha demostrado con anterioridad que p53 no sólo influye sobre el metabolismo energético (Gottlieb & Vousden, 2010), sino que, además, el efecto anti-tumoral del propio DCA es dependiente de la presencia de p53 no mutado (*wild type*) (Agnoletto et al., 2014; Allende-Vega et al., 2015). Concordando con esto, tanto las células de B-CLL como la línea celular de mieloma múltiple U266, en las que no se vio susceptibilización con el DCA (*Figura 4.17 y Figura 4.18C*), son mutantes para p53. Asimismo, la expresión de los

receptores de NKG2D e ICAM-1 en las células mencionadas no varió tras incubación con este fármaco (*Figura 4.19* y *Figura 4.21B*), e incluso aumentó la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> en las células Mec-1 WT (*Figura 4.20*).

**Tabla 4.1.** Resumen de efectos combinatorios y posibles mecanismos de susceptibilización del DCA en las líneas celulares ensayadas. Los tumores se pre-trataron con DCA (5 mM, 72 horas) y se enfrentaron a los eCTL o células eNK, provenientes de UCB-MC o PBMC, durante 16 horas a un ratio 1:1 (e:t). *Rojo*: sin efecto combinatorio. *Verde*: efecto combinatorio. La enumeración indica el orden de importancia del mecanismo para cada caso.

Línea celular	DCA + eCTL				DCA + eNK			
	Efecto combinatorio		Mecanismo		Efecto combinatorio		Mecanismo	
	UCB-MC	PBMC	UCB-MC	PBMC	UCB-MC	PBMC	UCB-MC	PBMC
Mec-1 WT			---	---			---	---
Mec-1 Bcl-x <sub>L</sub>			---	---			---	---
MM.1S			¿?	·FasL-Fas y TRAIL-DR4/DR5: Donante-dependiente ·MICA/B-NKG2D			¿?	1) ICAM-1-LFA-1 2)TRAIL-DR4/DR5

Por otro lado, en las células MM.1S, que son p53 wild type, sí se observa susceptibilización por parte del DCA, tanto en eCTL como en células eNK tanto de UCB-MC como de PBMC (*Figura 4.18A,B*). Esto correlaciona con el aumento de los receptores de superficie MICA/B, ULBP-1 e ICAM-1 tras incubación con DCA (*Figura 4.21A*). Aunque no se pudo caracterizar el mecanismo de susceptibilización para las expansiones con UCB-MC, sí se realizaron varios experimentos de bloqueo utilizando células efectoras derivadas de PBMC. Los resultados mostraron que, por una parte, para los eCTL las vías de susceptibilización eran dependientes de donante, existiendo una gran dependencia de los ligandos mortales FasL y TRAIL en uno, dependencia parcial en otro y sin influencia en un tercero, siendo más bien en este último predominante el sistema perforina-granzima (*Figura 4.24*). Por otra parte, también podría participar el sistema MICA/B-NKG2D, aunque los bloqueos no llegaron a ser estadísticamente significativos (*Figura 4.27*). Respecto a las células eNK, el bloqueo de la susceptibilización con RIK2 indican la influencia de la interacción TRAIL-DR4/DR5 en la susceptibilización inducida por el DCA (*Figura 4.25*). Por otra parte, el bloqueo de ICAM-1-LFA-1 elimina por completo la citotoxicidad para las eNK, tanto en las células tratadas como sin tratar (*Figura 4.26C*), indicando que este mecanismo también podría participar en la susceptibilización. Se ha descrito que p53 induce la expresión tanto de los ligandos de NKG2D (Soriani et al., 2017; Textor et al., 2011) como de ICAM-1 (Gorgoulis et al., 2003; Kleetsas, Pratsinis, Mariatos, Zacharatos, & Gorgoulis, 2004), en este último caso a través de la activación del factor de transcripción NF-κB, y ésta podría ser una explicación a los efectos de susceptibilización observados.

Como se ha comentado con anterioridad, sería interesante evaluar esta terapia con eCTL's y células eNK sobre muestras de pacientes de B-CLL o de mieloma múltiple, esta vez combinando esta terapia celular adoptiva con el uso del fármaco DCA. En vista de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, sería muy relevante evaluar con anterioridad al tratamiento el estatus de p53 en dichas muestras, con el objetivo de conocer la idoneidad de este tratamiento. El DCA, además, es un fármaco que lleva empleándose durante más de 30 años en clínica para el tratamiento contra la acidosis láctica (James et al., 2017) y cuyo efecto anti-tumoral se lleva estudiando desde hace una década (Michelakis et al., 2008). Por ello, esta terapia combinada sería hipotética y relativamente sencilla y segura de trasladar a la clínica para el tratamiento de los tumores estudiados.

#### ***4.1.4.2 Discusión sobre la susceptibilización de la metformina en tumores hematológicos a la acción citotóxica de eCTL y células eNK***

La metformina es un fármaco conocido por su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Además, actúa inhibiendo de forma moderada al complejo I de la mETC en la mitocondria, disminuyendo el uso de la vía OXPHOS (El-Mir et al., 2000). La menor incidencia de cáncer en pacientes diabéticos con este tratamiento suscitó el interés de este fármaco como tratamiento contra el cáncer (Evans et al., 2005), existiendo actualmente varios estudios clínicos en marcha (Vancura et al., 2018). Además de esto, se ha demostrado que la metformina modula la expresión del MHC-I en tumores (Oliveras-Ferraro et al., 2012). Por estas razones, se escogió también este fármaco como agente sensibilizador de las células tumorales a la acción citotóxica de los eCTL y células eNK obtenidas en este trabajo.

En la *Tabla 4.2* se encuentran resumidos los efectos combinatorios y los posibles mecanismos de susceptibilización de la metformina a la acción citotóxica de las células efectoras utilizadas. En las células Mec-1, en general, se puede observar un efecto combinatorio de este fármaco con las células inmunitarias, tanto de UCB-MC como de PBMC (*Figura 4.5*). En el caso de las células Mec-1 WT, esto correlaciona con el aumento en la expresión de MICA/B, ULBP-1 e ICAM-1 (*Figura 4.7A*). De lo visto en los bloqueos, éstos indican sin embargo que la interacción de NKG2D con sus receptores no parece contribuir a la sensibilización (*Figura 4.15*), pero LFA-1-ICAM-1 sí podría tener relevancia para las eNK derivadas de los PBMC (*Figura 4.14A*).

Respecto a las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, mientras que la acción de la metformina no las susceptibiliza a la citotoxicidad inducida por los eCTL y células eNK de los UCB-MC (*Figura 4.5C*), sí se ve un claro efecto combinatorio en ambas células efectoras derivadas de los PBMC (*Figura 4.5D*). De hecho, la muerte celular se eleva a los niveles obtenidos en las Mec-1 WT sin tratar

(Figura 4.5B). Como se ha comentado antes, la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 es un mecanismo habitualmente encontrado en tumores resistentes de B-CLL (Ruefli-Brasse & Reed, 2017). Por tanto, el hecho de superar esta resistencia con este tratamiento combinado es un resultado que puede tener relevancia desde un punto de vista clínico. Los resultados de los experimentos de bloqueo indican que el sistema TRAIL-DR4/DR5 tiene relevancia en la susceptibilización hacia los eCTL (Figura 4.12A), así como la interacción ICAM-1-LFA-1, ésta última especialmente en el caso de las eNK (Figura 4.14B).

**Tabla 4.2.** Resumen de efectos combinatorios y posibles mecanismos de susceptibilización de la metformina en las líneas celulares ensayadas. Los tumores se pre-trataron con metformina (2 mM, 72 horas) y se enfrentaron a los eCTL o células eNK, provenientes de UCB-MC o PBMC, durante 16 horas a un ratio 1:1 (e:t). *Rojo*: sin efecto combinatorio. *Amarillo*: tendencia combinatoria no significativa. *Verde*: efecto combinatorio. La enumeración indica el orden de importancia del mecanismo para cada caso.

Línea celular	Metformina + eCTL				Metformina + eNK			
	Efecto combinatorio		Mecanismo		Efecto combinatorio		Mecanismo	
	UCB-MC	PBMC	UCB-MC	PBMC	UCB-MC	PBMC	UCB-MC	PBMC
Mec-1 WT	Verde	Amarillo	¿?	PD-1-PD-L1	Verde	Amarillo	¿?	1) ICAM-1-LFA-1 2) PD-1-PD-L1
Mec-1 Bcl-x <sub>L</sub>	Rojo	Verde	---	1) TRAIL-DR4/DR5 2) ICAM-1-LFA-1	Rojo	Verde	---	1) ICAM-1-LFA-1 2) PD-1-PD-L1
MM.1S	Amarillo	Rojo	¿?	---	Amarillo	Rojo	¿?	---

Finalmente, mientras que la metformina parece susceptibilizar parcialmente las células MM.1S a las células efectoras de los UCB-MC (Figura 4.6A), esta susceptibilización no se observa para las células efectoras procedentes de PBMC (Figura 4.6B). En cualquier caso, la citotoxicidad de eCTL o eNK sobre las células MM.1S es mayoritariamente dependiente de la exocitosis granular y también de TRAIL, en el caso de las eNK (Figura 4.13).

Tras los diferentes experimentos de bloqueo, aunque se ha determinado la implicación del aumento en la expresión de ICAM-1 y de DR4/DR5 en la susceptibilización de las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> a los eCTL, así como del aumento de ICAM-1 en la susceptibilización de las células Mec-1 WT y Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> a las eNK, no se había determinado ninguna causa para explicar la susceptibilización de las células Mec-1 WT a los eCTL. La interacción del ligando de inhibición PD-L1 de las células tumorales con el receptor PD-1 de las células efectoras del SI ha adquirido gran relevancia en los últimos años con el desarrollo de anticuerpos monoclonales, contra el ligando o el receptor, que han obtenido efectos anti-tumorales muy significativos en la clínica (Sharma & Allison, 2015). Por otra parte, se ha descrito recientemente que la metformina produce una disminución en la expresión de PD-L1, al menos en las células de adenocarcinoma mamario humano MDA-MB-231 (Cha et al., 2018). En consecuencia, ensayamos si las células Mec-1 WT o Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> expresaban PD-L1 a nivel basal y si la metformina podía afectar a su expresión,

confirmando que ambas lo expresaban a nivel basal, aunque el nivel de expresión era mayor en las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, y que la metformina reducía la expresión de PD-L1 en Mec-1 WT, pero no en Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> (*Figura 4.8*). Si esta interacción estuviera implicada en la susceptibilización por metformina, se debería observar un aumento en la citotoxicidad basal en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-PD-1, que debería reproducirse en las muestras tratadas previamente tratados con metformina. Este fue el caso para la citotoxicidad mediada por los eCTL de un donante sobre las células Mec-1 WT (*Figura 4.16A*), aunque no se reprodujo con los eCTL de otro donante (*Figura 4.16B*). En este caso, sin embargo, sí que se observó el aumento de la citotoxicidad de las eNK sobre las células Mec-1 WT (*Figura 4.16B*). La participación de este sistema en la baja citotoxicidad de las células eNK sobre las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> se ha demostrado en el caso de este segundo donante, en el que el anticuerpo anti-PD-1 aumentó en gran medida tanto la citotoxicidad basal como en presencia de metformina (*Figura 4.16D*).

El hecho de que estos efectos dependan del donante o de la célula efectora utilizada en cada caso puede tener que ver con la expresión variable de PD-1 en la superficie de las células efectoras. De hecho, en un estudio reciente realizado por nuestro grupo usando células eNK de 6 donantes diferentes, se observó una gran variabilidad en el porcentaje de células positivas para la expresión de PD-1: mientras que en un donante la expresión era muy alta a día 0 (65%) y disminuía tras la expansión a 18%, esta expresión era baja a día 0 en el resto de los donantes y, o bien no variaba sustancialmente tras la expansión (3 donantes), o bien aumentaba significativamente hasta más del 50% (2 donantes) (Gascón, 2017). En cualquier caso, los datos aportados sugieren una implicación del sistema PD-1/PD-L1 en la susceptibilización inducida por metformina, tal y como se indica en la *Tabla 4.2*.

La metformina es un fármaco metabólico que, al igual que el DCA, es capaz de activar a la AMPK debido al estrés energético que causa en las células tumorales (Faubert et al., 2015). Si esta fuera la vía que explica la susceptibilización en ambos casos, cabría esperar que el mecanismo fuera en cierto modo parecidos. No obstante, los resultados obtenidos indican precisamente lo opuesto: de modo general, mientras que el DCA es incapaz de sensibilizar a las células Mec-1 y sí lo consigue en las células MM.1S, la metformina sí favorece la sensibilización de las células Mec-1 y apenas lo consigue para las células MM.1S. Como ya se ha comentado, el DCA puede activar a p53 vía AMPK para ejercer este efecto (Agnoletto et al., 2014; Allende-Vega et al., 2015). No obstante, se ha descrito que la metformina puede inhibir la síntesis de glucosa (Foretz et al., 2010), así como al complejo I mitocondrial (Stephenne et al., 2011) de forma independiente de la AMPK, sugiriendo mecanismos de acción distintos a otros fármacos metabólicos. Se ha descrito en dos trabajos anteriores el aumento de la expresión de DR5 por la

metformina (Hong et al., 2016; R. Tanaka, Tomosugi, Horinaka, Sowa, & Sakai, 2015), y en uno de ellos se ha demostrado que el mecanismo depende de la activación de JNK (Hong et al., 2016). Sin embargo, en el caso de los ligandos de NKG2D o de ICAM-1 no hay datos en la literatura que sugieran algún mecanismo que explique su inducción. De hecho, se ha descrito lo contrario en las células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, aunque en ese estudio las dosis de metformina utilizada es de 100  $\mu$ M, mucho menor que la usada en este trabajo y fuera del rango de actividad clínica en diabetes de tipo 2 (Schexnayder et al., 2018). En la actualidad, se sigue tratando de caracterizar el efecto a nivel molecular que produce la metformina en las células. En cualquier caso, su seguridad en pacientes se ha demostrado ampliamente en el tratamiento de la diabetes tipo 2, además de en los ensayos clínicos en varios tipos de tumores que se están llevando a cabo en la actualidad (Vancura et al., 2018). Por tanto, el empleo hipotético de esta terapia combinada con inmunoterapia en la clínica podría ser factible desde un punto de vista farmacológico.

Dentro del campo de la terapia celular adoptiva, el uso de la tecnología CAR-T en los últimos años ha estado produciendo respuestas en clínica muy favorables (J. C. Yang & Rosenberg, 2016). De hecho, su uso ha sido recientemente aprobado por la FDA para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda refractaria y para el linfoma B difuso de célula grande (McHayleh, Bedi, Sehgal, & Solh, 2019). A pesar de ello, el precio actual para este tipo de tratamiento es bastante elevado, limitando su potencial actual en la clínica (Roth et al., 2018). Es por ello que la búsqueda de otras alternativas, incluso dentro de este sector de la inmunoterapia, también sea necesaria para combatir al cáncer. Además de esto, el presente trabajo es el primer estudio que correlaciona la acción del DCA o la metformina en los tumores humanos con el aumento en la expresión de receptores como MICA/B, ULBP-1 o ICAM-1. La terapia combinada del uso de fármacos metabólicos, como el DCA o la metformina, para sensibilizar a los tumores a la acción citotóxica de CTL's o células NK activadas y expandidas *in vitro* supone, como ya se ha expuesto durante esta discusión, un acercamiento prometedor para tratar varios tipos de tumores de origen hematológico, además de constituir una opción que reduce el esfuerzo económico en comparación con otras terapias.



## 4.2 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE DCA E IBRUTINIB SOBRE TUMORES DE ORIGEN HEMATOLÓGICO

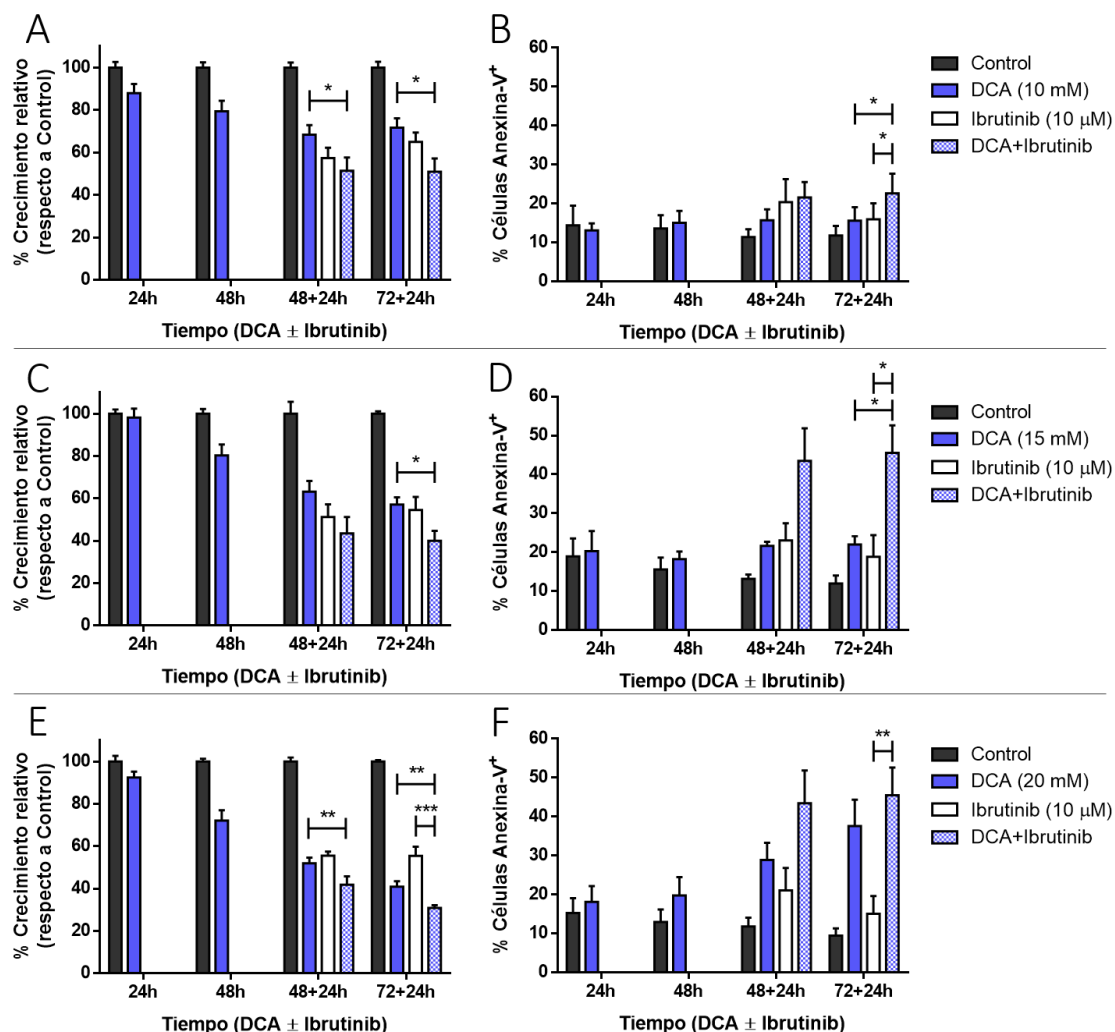
El DCA, como se ha comentado durante esta Tesis y en vista de los resultados obtenidos hasta ahora, es un fármaco capaz no sólo de alterar el metabolismo tumoral sino también de modular la sensibilidad de las células tumorales a la acción de otras terapias. El ibrutinib es un fármaco que inhibe el crecimiento de algunos tumores por inhibición de la enzima BTK. Su uso en clínica, aunque está proporcionando buenos resultados, no está exento de ciertos efectos secundarios (Bond & Woyach, 2019). Por ello, se quiso comprobar si la combinación de ambos fármacos era capaz de mostrar un efecto combinatorio en tumores de origen hematológico.

### 4.2.1 Efecto de la combinación de DCA e ibrutinib sobre líneas celulares tumorales

En primer lugar, se evaluó el efecto del DCA y el ibrutinib en líneas celulares tumorales. Las células que se escogieron para realizar los ensayos son: la línea celular de mieloma múltiple U266, y las líneas celulares de B-CLL: Mec-1 WT, Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> y Mec-1 Mcl-1. Para todas ellas, se sembraron al comienzo del tratamiento a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml y se incubaron a distintas concentraciones de DCA (10-20 mM) durante 24-72 horas. Tras 48 o 72 horas de incubación, se añadió el fármaco ibrutinib (10  $\mu$ M) durante 24 horas. Se escogió esta concentración fija de ibrutinib por ser relevante en la clínica y por inducir una inhibición del crecimiento aproximada al 50% en las células ensayadas (datos mostrados en las Figuras de este apartado). La inhibición del crecimiento se evaluó por MTT y la muerte celular se midió por marcaje con Anexina-V y análisis en un citómetro de flujo.

Los resultados de esta terapia combinada muestran, para las células U266, que el DCA es capaz de sensibilizar a esta línea celular al ibrutinib, observándose un efecto combinatorio a las 96 horas a una concentración de 15 mM de DCA (*Figura 4.28D*) y también a 10 mM, aunque la apoptosis observada no es muy elevada (*Figura 4.28B*). Respecto la concentración de 20 mM, se puede detectar también un aumento de la muerte en la terapia combinada, si bien el DCA por sí sólo parece inducir gran parte de este efecto (*Figura 4.28F*). Respecto a la inhibición del crecimiento, el efecto del DCA también es dosis-dependiente, llegándose a observar un efecto significativo para la combinación de ambos fármacos en algún caso (*Figura 4.28E*). Además, se puede apreciar el efecto citostático del ibrutinib, y un efecto más bien citotóxico del DCA sobre estas células (*Figura 4.28*).

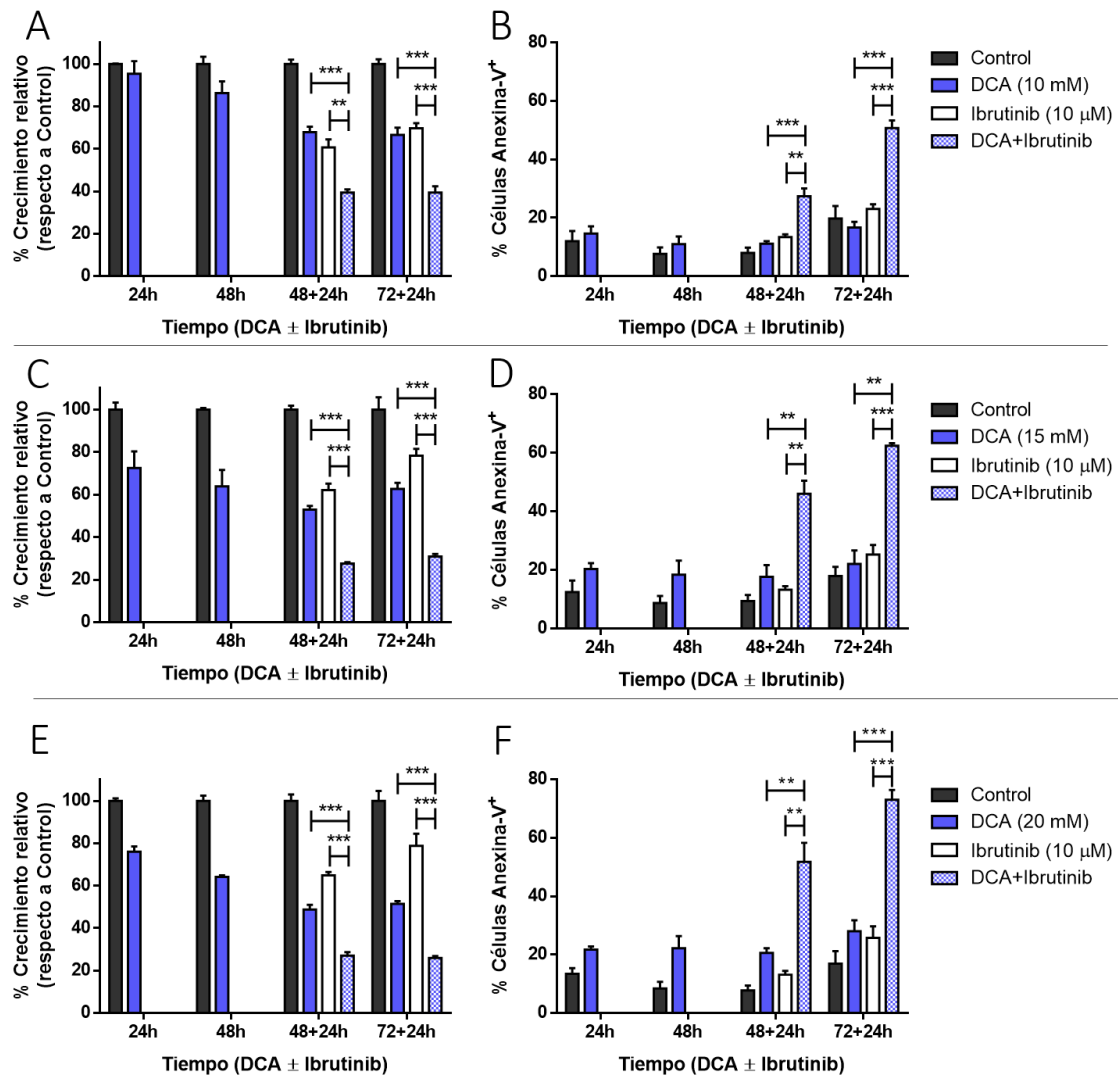
## U266



**Figura 4.28.** Efecto combinatorio del DCA e ibrutinib en la línea celular de mieloma múltiple U266. Las células se incubaron durante 24-72 horas con DCA a 10 mM (A),(B), 15 mM (C),(D) o 20 mM (E),(F) y se añadió ibrutinib (10 μM) otras 24 horas. Los resultados muestran la media ± SD de la inhibición del crecimiento (A),(C),(E) y la apoptosis (B),(D),(F) inducida de al menos 3 experimentos diferentes. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

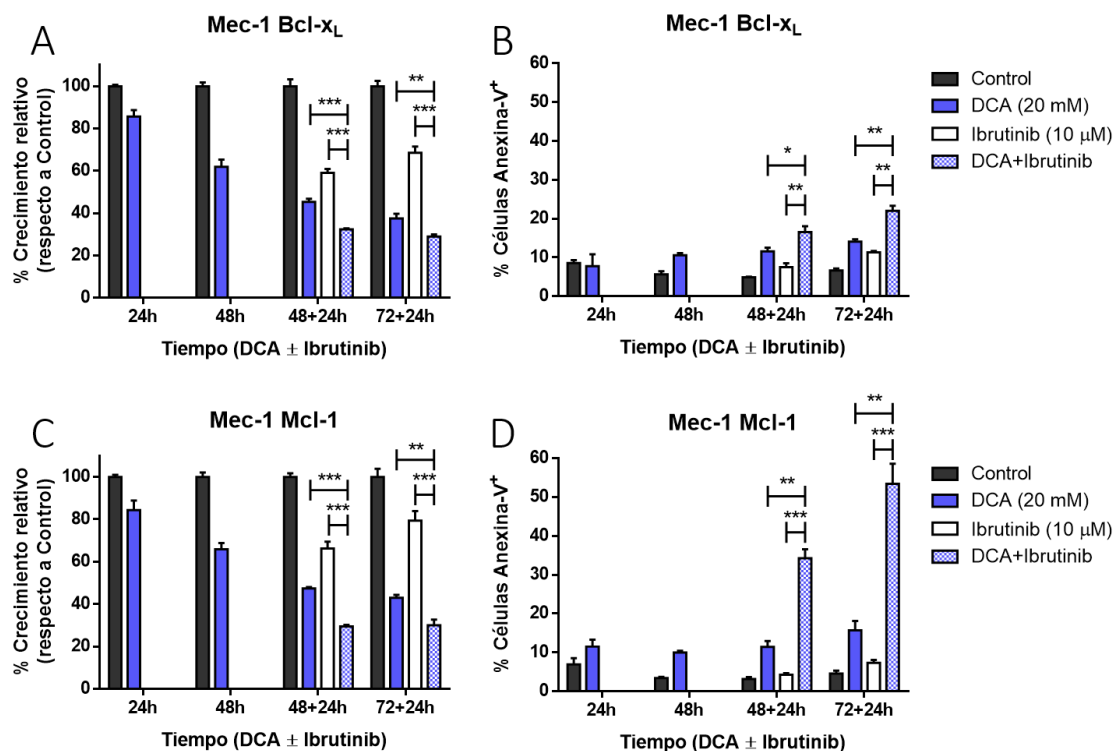
De las líneas celulares de B-CLL, comenzando por las células Mec-1 WT, sí pudo observarse efecto combinatorio de ambos fármacos, tanto en la inhibición del crecimiento como en la inducción de apoptosis, en las tres concentraciones de DCA utilizadas (Figura 4.29). El efecto del DCA, tanto sólo como en combinación con ibrutinib fue dosis y tiempo - dependiente, alcanzando una media máxima de 73% de inducción de apoptosis y una disminución del crecimiento al 23% para las 96 horas con DCA (20 mM) con ibrutinib (Figura 4.29E,F). Para estas células, el efecto citotóxico del DCA fue menos acentuado, ejerciendo un mayor papel citostático en comparación con su acción sobre las células U266 (Figura 4.28 y Figura 4.29).

## Mec-1 WT



**Figura 4.29.** Efecto combinatorio del DCA e ibrutinib en la línea celular de B-CLL Mec-1 WT. Las células se incubaron durante 24-72 horas con DCA a 10 mM (A),(B), 15 mM (C),(D) o 20 mM (E),(F) y se añadió ibrutinib (10 μM) otras 24 horas. Los resultados muestran la media ± SD de la inhibición del crecimiento (A),(C),(E) y la apoptosis (B),(D),(F) inducida de n=3. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

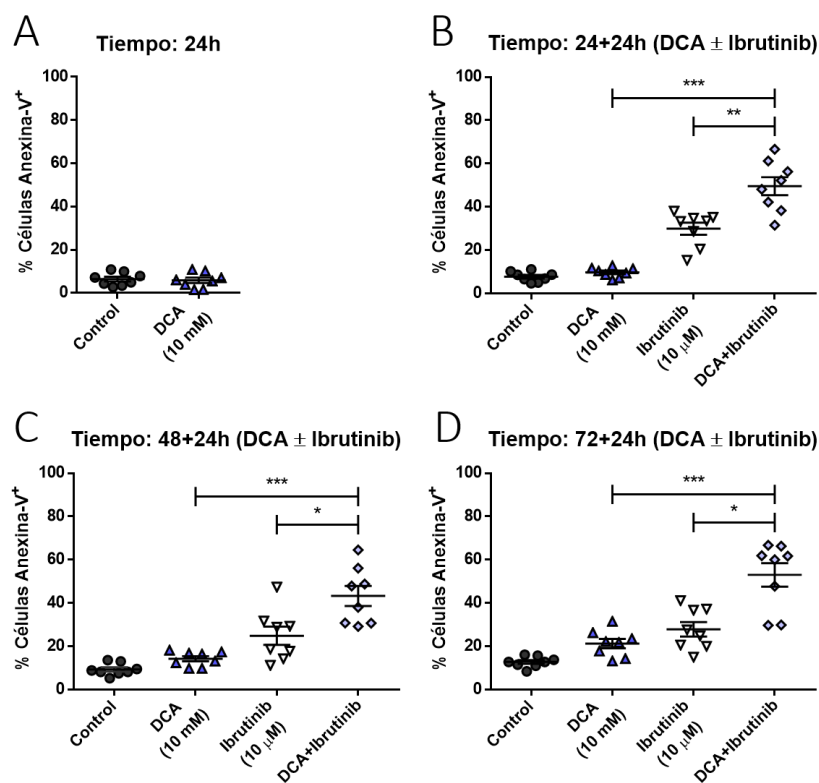
Finalmente, en la *Figura 4.30* se muestran los resultados obtenidos de esta combinación de fármacos en las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> y Mec-1 Mcl-1. En este caso, la concentración de DCA se fijó en 20 mM. Para ambos casos, el DCA fue capaz de sensibilizar a las células de forma significativa a la acción del ibrutinib (*Figura 4.30*). Asimismo, este efecto combinatorio fue mucho más acentuado para las Mec-1 Mcl-1 (*Figura 4.30D*) que para las Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, donde, a pesar de ver efectos significativos, la apoptosis inducida es mucho menor (*Figura 4.30B*). No obstante, la inhibición del crecimiento fue similar en ambos casos (*Figura 4.30A,C*).



**Figura 4.30.** Efecto combinatorio del DCA e ibrutinib en las líneas celulares de B-CLL Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> y Mec-1 Mcl-1. Las células se incubaron durante 24-72 horas con DCA a 20 mM y se añadió ibrutinib (10 μM) otras 24 horas. Los resultados muestran la media ± SD de la inhibición del crecimiento y la apoptosis inducida en las células Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> (A),(B) y Mec-1 Mcl-1 (C),(D) de n=3. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

#### 4.2.2 Efecto de la combinación de DCA e ibrutinib sobre muestras de pacientes de B-CLL

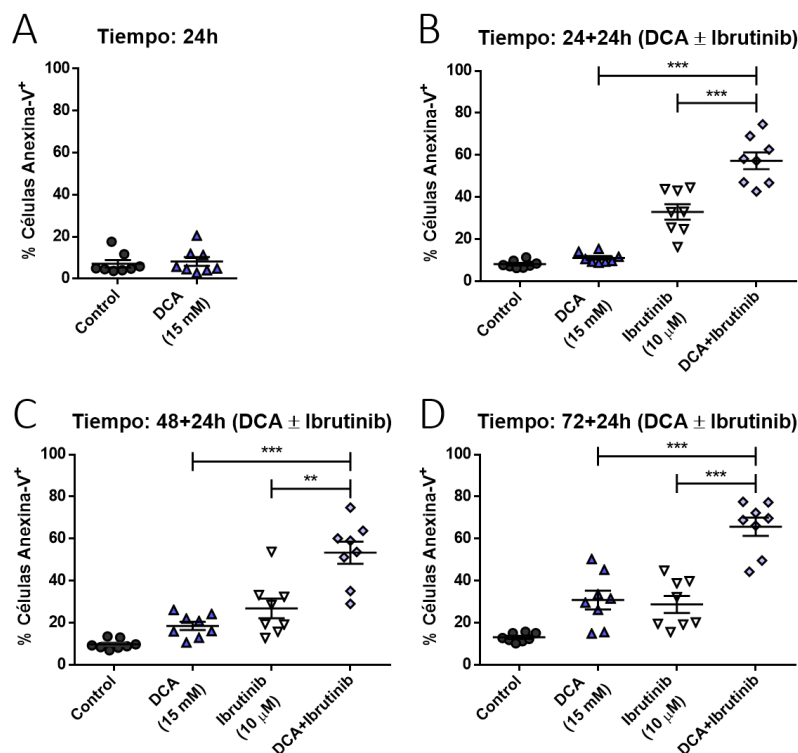
Después de comprobar el efecto de esta combinación de fármacos sobre líneas celulares tumorales, se propuso ensayar dicha capacidad de inducir apoptosis también en muestras obtenidas de pacientes de B-CLL. Brevemente, los PBMC se aislaron de muestras de sangre periférica y tras el conteo, se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml en placas de 96 pocillos para los experimentos, y en presencia de IL-4 (100 IU/ml). Seguidamente, se incubaron con DCA (10-20 mM) durante 24-72 horas, momento en el que se adicionó ibrutinib (10 μM) durante otras 24 horas. Finalmente, la inducción de apoptosis se midió por marcaje con Anexina-V y análisis en un citómetro de flujo.



**Figura 4.31.** Efecto combinatorio del DCA e ibrutinib en muestras de pacientes de B-CLL. Las células se incubaron durante 24 horas (A),(B), 48 horas (C) o 72 horas (D) con DCA (10 mM) y se añadió ibrutinib (10  $\mu$ M) otras 24 horas (B-D). Los resultados muestran la media  $\pm$  SD de la inhibición del crecimiento y la apoptosis inducida en 4 muestras de B-CLL (n=8). \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001.

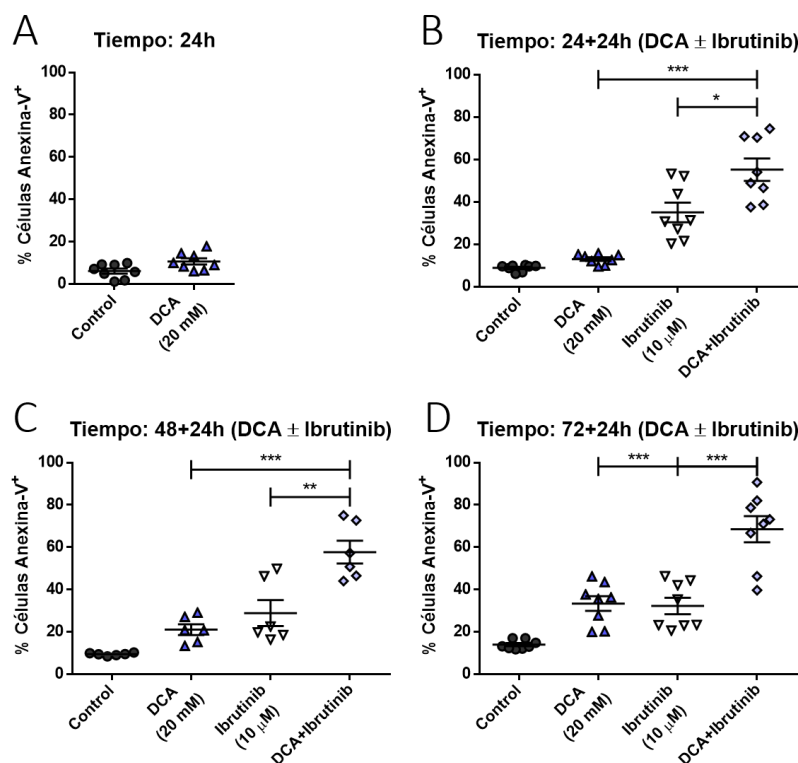
En la *Figura 4.31* se muestran los resultados para la combinación de DCA, a 10 mM, con ibrutinib (10  $\mu$ M). Esta terapia combinada consiguió sensibilizar de manera significativa a las células de los pacientes de B-CLL a la acción conjunta de los dos fármacos (*Figura 4.31*). Este efecto combinatorio se puede observar ya a las 48 horas totales de incubación (*Figura 4.31B*), sin apenas variar con mayores tiempos de incubación con DCA (*Figura 4.31C,D*).

Cuando se empleó una concentración mayor de DCA (15 mM), también se detectó una inducción de apoptosis mayor con la terapia combinada a todos los tiempos de incubación empleados (*Figura 4.32*). De hecho, se llega a alcanzar una media de citotoxicidad alrededor del 60% (*Figura 4.32D*). Otro aspecto a destacar es el aumento en la inducción de apoptosis del DCA en solitario de forma dependiente del tiempo (*Figura 4.32D*).



**Figura 4.32.** Efecto combinatorio del DCA e ibrutinib en muestras de pacientes de B-CLL. Las células se incubaron durante 24 horas (A),(B), 48 horas (C) o 72 horas (D) con DCA (15 mM) y se añadió ibrutinib (10 μM) otras 24 horas (B-D). Los resultados muestran la media ± SD de la inhibición del crecimiento y la apoptosis inducida en 4 muestras de B-CLL (n=8). \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Por último, se detectó el mismo efecto combinatorio de ambos fármacos, empleando una concentración de DCA de 20 mM (Figura 4.33), aunque con una inducción de muerte por parte del DCA algo mayor (Figura 4.33D).



**Figura 4.33.** Efecto combinatorio del DCA e ibrutinib en muestras de pacientes de B-CLL. Las células se incubaron durante 24 horas (A),(B), 48 horas (C) o 72 horas (D) con DCA (20 mM) y se añadió ibrutinib (10 μM) otras 24 horas (B-D). Los resultados muestran la media ± SD de la inhibición del crecimiento y la apoptosis inducida en 4 muestras de B-CLL (n=8). \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

### 4.2.3 Discusión sobre el efecto combinatorio de DCA con ibrutinib en tumores de origen hematológico

Tanto el DCA como el ibrutinib son fármacos que han demostrado tener efectos anti-tumorales sobre células tumorales hematológicas: el primero, por su efecto combinado con otros fármacos (Allende-Vega et al., 2015; Sanchez et al., 2013; Voltan, Rimondi, Melloni, Gilli, et al., 2016), mientras que el segundo por su empleo en ensayos clínicos, solo o en combinación con otros agentes de quimioterapia (Stilgenbauer et al., 2016). Por tanto, se propuso analizar su efecto sobre tumores de este tipo en su conjunto.

Este efecto combinatorio fue efectivo para la inhibición del crecimiento y la apoptosis en las células Mec-1 WT a todas las concentraciones de DCA utilizadas, con una curva dosis y tiempo - dependiente (*Figura 4.29*). Estos resultados contrastan con lo observado en estas mismas células cuando se combinó el DCA con los eCTL y las células eNK de UCB-MC y PBMC, donde no se consiguió ningún efecto combinatorio positivo en la inducción de apoptosis (*Figura 4.17*). En la Discusión anterior, la explicación a esta falta de sinergia se correlacionó con la dependencia del estado de la proteína p53 para el efecto sensibilizador del DCA (ver *Apartado 4.1.4.1*). Para estos resultados, a pesar de que las células Mec-1 poseen un p53 mutado, el DCA sí actuó sensibilizando a las células. Una posible explicación a este comportamiento es que se ha descrito un mecanismo de actuación del DCA independiente de p53 (Agnoletto et al., 2015). Según este estudio, el DCA es capaz de regular la expresión de p21 en las células, quien a su vez puede provocar una disfunción mitocondrial y un paro del ciclo celular (Agnoletto et al., 2015). Esto acercaría a las células tratadas con DCA al ya mencionado umbral apoptótico, donde las células, al poseer mitocondrias funcionalmente alteradas, se encontrarían más predispuestas a sucumbir ante un estímulo apoptótico (Ni Chonghaile et al., 2011). Otra explicación a este comportamiento del DCA es el hecho de haber empleado dosis más elevadas de este fármaco (10-20 mM) respecto a los experimentos anteriores (5 mM). Sería interesante repetir en un futuro estos experimentos a una dosis reducida de DCA (5 mM), para averiguar la capacidad sensibilizadora de este fármaco en esta terapia combinada.

Respecto a las otras dos líneas celulares de B-CLL utilizadas, tanto para las Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> como para las Mec-1 Mcl-1 se observa un efecto sensibilizador del DCA (a una dosis de 20 mM) en la inducción de apoptosis en combinación con ibrutinib (*Figura 4.30*). No obstante, la muerte celular obtenida (a las 96 horas) disminuyó de un 73% de media en las Mec-1 WT, a 53% para las Mec-1 Mcl-1 (*Figura 4.30D*) y a 22% en las Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> (*Figura 4.30B*). Esto sugiere un papel

importante de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 en la sensibilización por parte del DCA al ibrutinib, especialmente en el caso de Bcl-x<sub>L</sub>.

Para finalizar con las células de B-CLL, se analizó el efecto de esta terapia combinada en muestras de pacientes de este tipo de cáncer. Tres de los cuatro tumores mostraron respuesta positiva en la sensibilización del DCA a la acción del ibrutinib a todas las dosis de DCA empleadas (10-20 mM), mientras que una se mostró resistente (*Figura 4.31*, *Figura 4.32* y *Figura 4.33*). Sin embargo, la media de los 4 pacientes indicó un efecto sinérgico estadísticamente significativo. Para estos experimentos, se probó la sensibilización del DCA acortando a 24 horas el tiempo de incubación con los tumores. Esto se realizó por obtener resultados a tiempos más cortos, en caso que las células de los pacientes no llegaran a aguantar viables durante 72 o 96 horas en cultivo. Aún así, también se obtuvo efecto combinatorio estadísticamente significativo para todas las dosis empleadas (*Figura 4.31B*, *Figura 4.32B* y *Figura 4.33B*), siendo este acortamiento del tratamiento relevante desde un punto de vista clínico. Un análisis de la expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2 sobre muestras de pacientes de B-CLL podría arrojar luz sobre los mecanismos de sensibilidad y de resistencia de este tratamiento. Estos resultados permitirían reducir la dosis de ibrutinib empleada en clínica, lo cual puede ser importante dado los efectos adversos reportados recientemente (Bond & Woyach, 2019).

Aparte de los ensayos realizados con las células de B-CLL, también se ensayó esta combinación de fármacos sobre la línea celular de mieloma múltiple U266. En este caso, el efecto citostático y citotóxico del DCA es más evidente, aumentando la muerte de las células de forma dosis - dependiente (*Figura 4.28*). A pesar de ello, sí pudo detectarse un efecto combinatorio del DCA con ibrutinib sobre la muerte celular para la dosis de 15 mM de DCA (*Figura 4.28D*). De nuevo, estas células poseen mutado el p53 y, a pesar de ello, sí puede verse efecto combinatorio, reforzando la idea del mecanismo de acción del DCA independiente de p53 en este caso (Agnoletto et al., 2015). También es cierto que, para poder comparar mejor con los resultados de su combinación con los eCTL y las células eNK, habría que equiparar ambas concentraciones de DCA. Otra idea interesante para investigar la relevancia de p53 en esta terapia sería evaluarla en las células MM.1S, también de mieloma múltiple, pero con un p53 intacto. Finalmente, para el caso de mieloma múltiple, no se llegó a analizar su efecto en muestras de pacientes de este tipo de tumor, lo cual sería de nuevo muy interesante y daría relevancia clínica al estudio.



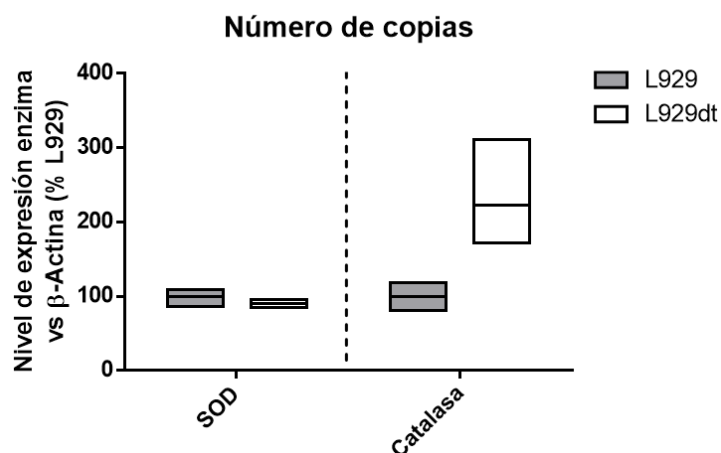
### 4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR L929dt COMO POSIBLE MODELO DE METÁSTASIS *IN VITRO*

En un estudio previo de nuestro grupo, se generó de forma espontánea una línea celular derivada del fibroblasto de ratón transformado L929, capaz de crecer despegada de la placa de cultivo y que se denominó como *L929dt* (del inglés “*detached*”) (Catalán et al., 2015). Éste y posteriores trabajos de nuestro grupo han demostrado que estas células poseen características fenotípicas que se asemejan a las de células tumorales en estadio metastásico (W. Duan et al., 2014) (Urra et al., 2017), tales como: pérdida de expresión del MHC-I, alto consumo de glucosa y sensibilidad al fármaco DCA, disfunciones en la formación de SC's en la cadena respiratoria o alteración en la producción de ROS (Catalán et al., 2015; Marco, 2015) (ver *Apartado 2.3*). Por todo ello, parte del trabajo de esta Tesis ha consistido en seguir caracterizando esta línea celular, que podría considerarse un modelo de metástasis *in vitro*.

#### 4.3.1 Mecanismos de resistencia al estrés oxidativo

En estudios previos, se determinó la cantidad basal de ROS de las células L929dt, en comparación con sus células parentales L929. Como resultado, se obtuvo que las primeras poseían un nivel de ROS (mayoritariamente,  $H_2O_2$ ) mayor que las segundas, y que la cantidad de  $O_2^-$  era comparable entre ambas (ver *Figura 2.1D*). Para tratar de explicar las diferencias observadas, se quiso analizar la expresión y la actividad de dos de las principales enzimas que reducen el estrés oxidativo en las células: la catalasa, que transforma el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno, y la superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial, que cataliza la transformación de  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ .

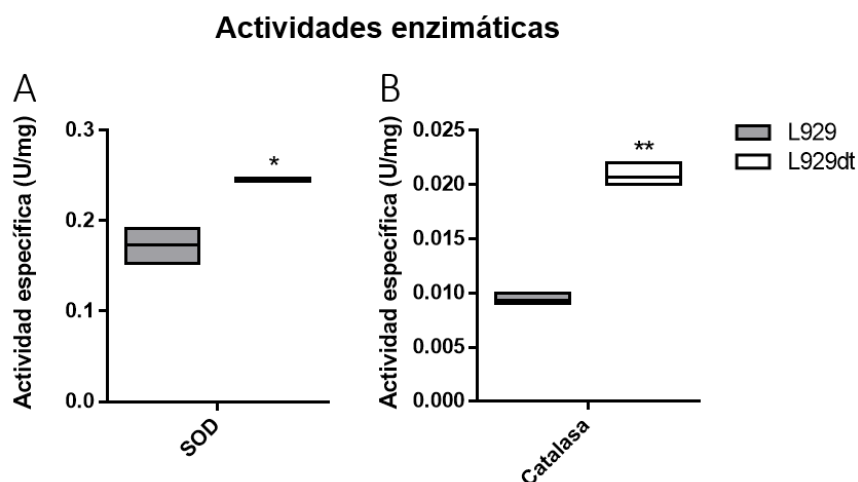
En primer lugar, se analizó la expresión de genes de estas enzimas mediante la medida del número de copias de sus cDNA's por qPCR. Para ello, se aisló el RNA de las células en cultivo y se obtuvo el cDNA a partir de ellas, tal como se describe en el *Apartado 3.4.6*. Seguidamente, se llevaron a cabo qPCR de los genes de interés y, adicionalmente, de la  $\beta$ -actina para normalizar los resultados. Los cebadores empleados para realizar estas medidas, así como la fórmula para el cálculo del número de copias de los transcritos se encuentran recogidos en el *Apartado 3.4.7.2*.



**Figura 4.34.** Número de copias de los genes que codifican las enzimas SOD y catalasa en las células L929 y L929dt. El cDNA de estas células fue obtenido a partir del de su RNA mediante RT-PCR y la expresión de estos genes fue analizada por RT-PCR. Las gráficas muestran el porcentaje del número de copias de cada enzima normalizado por el de la  $\beta$ -actina respecto a la línea L929. Los resultados son la media  $\pm$  SD de  $n=3$ .

Los resultados obtenidos para este experimento reflejan, por una parte, que las células L929dt poseen un número de copias de SOD similar a las células parentales (*Figura 4.34*). No obstante, sí que parece haber una tendencia a una mayor expresión de la enzima catalasa, aunque el resultado no llegó a ser significativo ( $p=0.07$ ) (*Figura 4.34*).

Con el objetivo de confirmar la tendencia observada en las RT-PCR, se evaluó también las actividades de ambas enzimas antioxidantes. Se obtuvieron extractos proteicos de ambas líneas celulares y se midieron las actividades enzimáticas por espectrofotometría, tal como se describe en el *Apartado 3.5*.

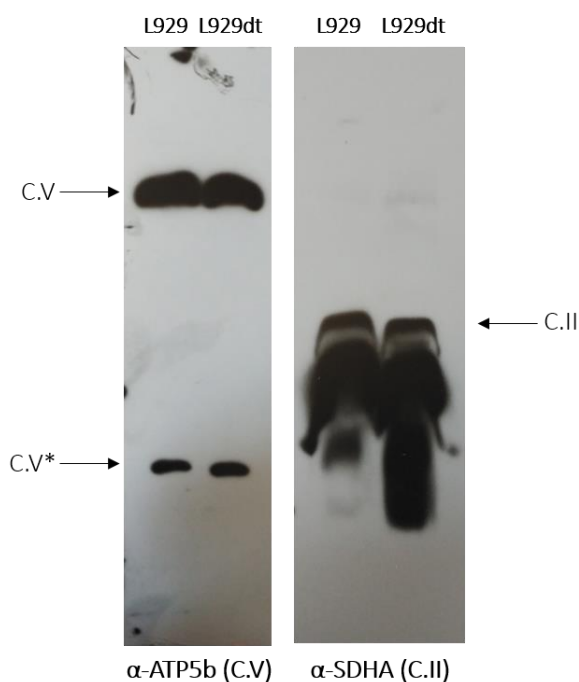


**Figura 4.35.** Actividades enzimáticas de la catalasa y la SOD en las células L929 y L929dt. Los resultados muestran las actividades específicas de las enzimas (A) SOD y (B) catalasa, medidas por espectrofotometría, de las células L929 y L929dt con  $n=3$ . \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ .

Tal y como se aprecia en la *Figura 4.35*, la actividad de ambas enzimas antioxidantes está aumentada para las células L929dt en comparación con las células parentales. Esto concuerda con los resultados obtenidos anteriormente, donde las células L929dt producían una cantidad mayor de ROS (*Figura 2.1*), es decir: el aumento en la actividad de estas enzimas surgiría como un mecanismo de defensa de dichas células frente al estrés oxidativo.

### 4.3.2 Implicación del C.V en el fenotipo de las células L929dt

Otro aspecto que se quiso averiguar fue la posible participación del C.V en la disfunción mitocondrial que presentan las células L929dt en comparación con sus parentales (ver *Figura 2.1C*). Para llevarlo a cabo, se aislaron las mitocondrias de ambas líneas celulares y se separaron las proteínas que lo contienen por electroforesis “Blue Native” (BN), tal como se indica en los *Apartados 3.2.5 y 3.2.6*. Finalmente, se analizó la expresión del C.V por Western-Blot, empleando el C.II como control de carga.



**Figura 4.36.** Western-Blotting de los complejos II ( $\alpha$ -SDHA) y V ( $\alpha$ -ATP5b) de la mETC de las líneas celulares L929 y L929dt. Se extrajeron las mitocondrias de ambas líneas celulares y se realizó una electroforesis “Blue Native”. Seguidamente, se transfirieron las proteínas separadas a una membrana y se realizaron los inmunoblots. \*Banda inespecífica.

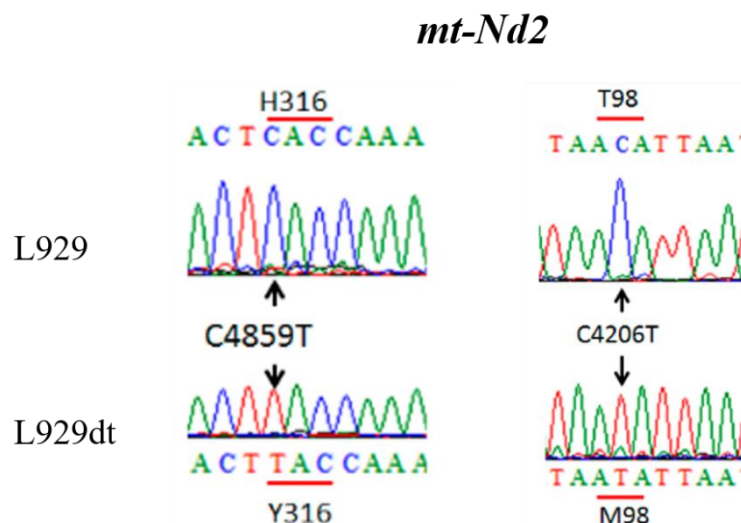
A diferencia de lo observado para el resto de complejos analizados anteriormente (C.I, C.III y C.IV, ver *Figura 2.1C*), la expresión del C.V no pareció alterarse en las células L929dt con respecto a las células L929 (*Figura 4.36*). La densitometría realizada para estas bandas tampoco ofreció diferencias entre ambas (datos no mostrados).

### 4.3.3 Secuenciación del mtDNA de las células L929 y L929dt

Se planteó seguidamente la posibilidad de que las mitocondrias de las células L929dt, y más concretamente, su C.I, estuviera dañado a nivel genómico. Es por ello que se decidió secuenciar los genes del mtDNA que codifican subunidades del C.I y compararlo con el de las células parentales L929.

La secuenciación del mtDNA se realizó en la Unidad de Genómica del Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. El mtDNA de las células de interés se aisló y los genes de las 7 subunidades del C.I codificadas en el mismo se

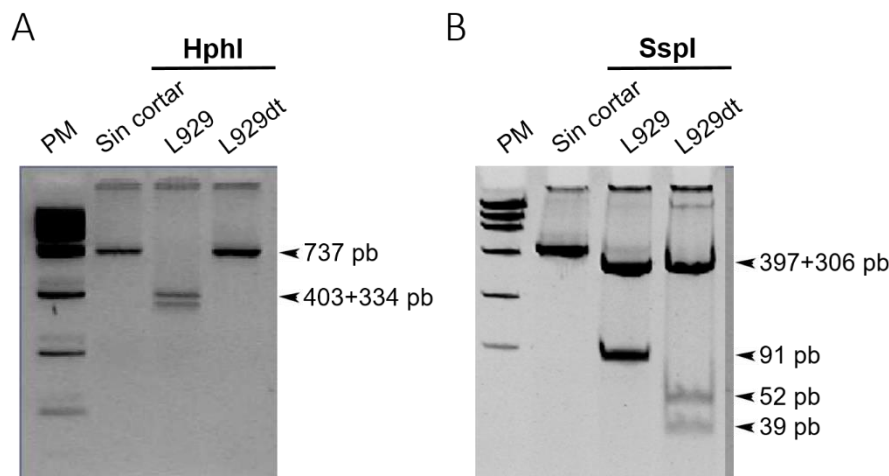
amplificaron por PCR. A continuación, se purificaron y se enviaron junto con los cebadores necesarios para su secuenciación (ver protocolo en *Apartado 3.4.4*). Los resultados obtenidos se analizaron empleando los softwares informáticos BioEdit 5.0.9 o Chromas 1.43.



**Figura 4.37.** Mutaciones encontradas en las células L929dt respecto a las células parentales L929. Los fragmentos de mtDNA de interés se aislaron, se amplificaron por PCR, se purificaron y se enviaron a la Unidad de Genómica del Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid para su secuenciación.

En la *Figura 4.37* se muestran las mutaciones encontradas en el mtDNA de las células L929dt. Como se puede observar, se encontraron dos mutaciones en estas células, ambas localizadas en el gen de la subunidad ND2 del C.I de la cadena respiratoria. Estas mutaciones consisten en dos cambios de base, una consistente en C4859T y otra en C4206T (*Figura 4.37*). Estas diferencias provocan, en consecuencia, el cambio de aminoácido codificado: de histidina a tirosina, y de treonina a metionina, respectivamente, en la subunidad ND2 del C.I (*Figura 4.37*).

Para confirmar las mutaciones encontradas en la secuenciación, se llevó a cabo una amplificación por PCR de los fragmentos que la contenían y una posterior digestión con enzimas de restricción, como se indica en el *Apartado 3.4.5*. Brevemente, la mutación C4859T elimina un sitio de reconocimiento para la enzima HphI, mientras que la mutación C4206T genera un sitio de corte adicional para la enzima SspI. Después de la digestión, los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y la aparición de las bandas correspondientes se visualizó en un transiluminador (GelDoc 2000, BioRad), utilizando el programa informático Quantity One v.4.6.5.



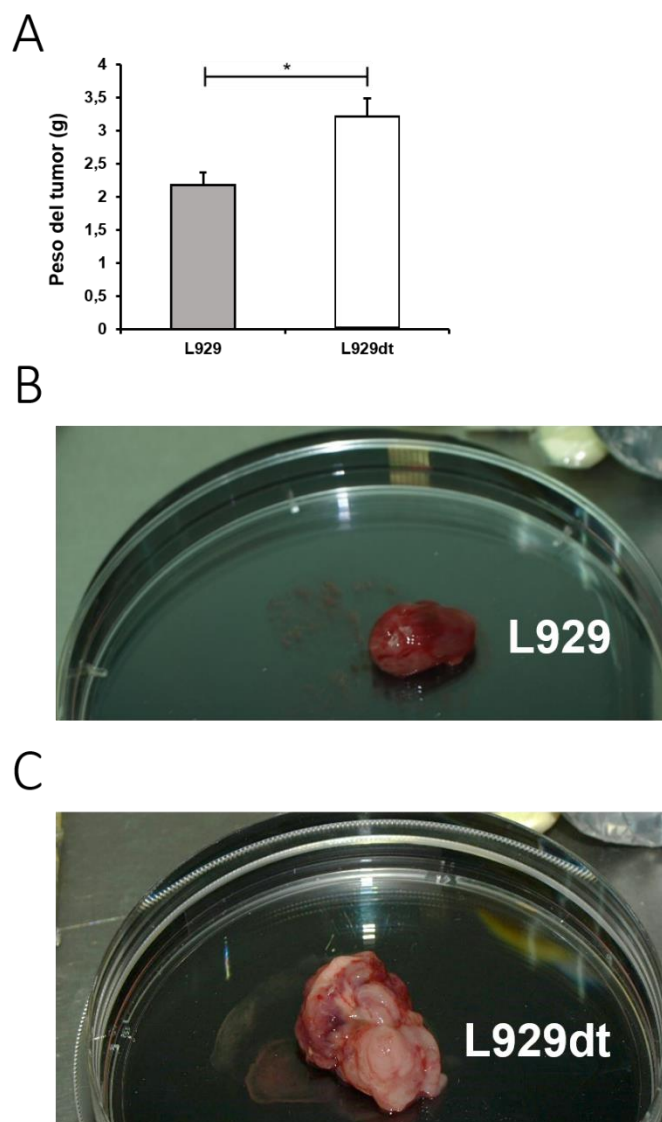
**Figura 4.38.** Verificación de las mutaciones C4859T y C4206T en las células L929dt por RFLP. Los fragmentos de mtDNA que contenían cambios entre las células L929 y L929dt se amplificaron por PCR, se digirieron con enzimas de restricción: (A) HphI para 4859; y (B) SspI para 4206, y se separaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) o de poliacrilamida al 10% (p/v), respectivamente.

Los resultados de la RFLP muestran, por una parte, que la enzima HphI no genera en las células L929dt los dos fragmentos de 403 y 334 pares de bases, observándose una sola banda de 737 pares de bases, mientras que en las células parentales L929 sí se puede apreciar la digestión del fragmento (*Figura 4.38A*). Por otra parte, en las células L929dt se ve la formación de 3 fragmentos (306, 79 y 39 pares de bases) por la acción de SspI, mientras que en las células L929 sólo se produce un corte, observándose dos bandas (306 y 118 pares de bases) (*Figura 4.38B*). Todo ello confirma en su conjunto la presencia de las dos mutaciones en *ND2* (C4859T y C4206T) en las células L929dt.

#### 4.3.4 Capacidad tumorigénica de las células L929dt *in vivo* por inyección subcutánea

Una parte importante en la caracterización de las células L929dt como posible modelo de célula metastásica, es tratar de demostrar que posee una mayor habilidad de formar tumores *in vivo*. Es por ello que se realizó un primer ensayo para comprobar y comparar su capacidad tumorigénica, respecto a sus células parentales, en ratones atímicos. Este modelo de ratón se escogió debido a que las células L929 pueden formar tumores en este tipo de ratones, pero no en inmunocompetentes (Blackburn et al., 1997).

Para el experimento, se emplearon dos grupos de tres ratones atímicos, a los que se les inyectó de manera subcutánea  $10^6$  células L929 o L929dt. Se realizó un seguimiento de la evolución de los tumores durante 3 semanas, momento en el que se sacrificaron los ratones y se extrajeron y pesaron los tumores.

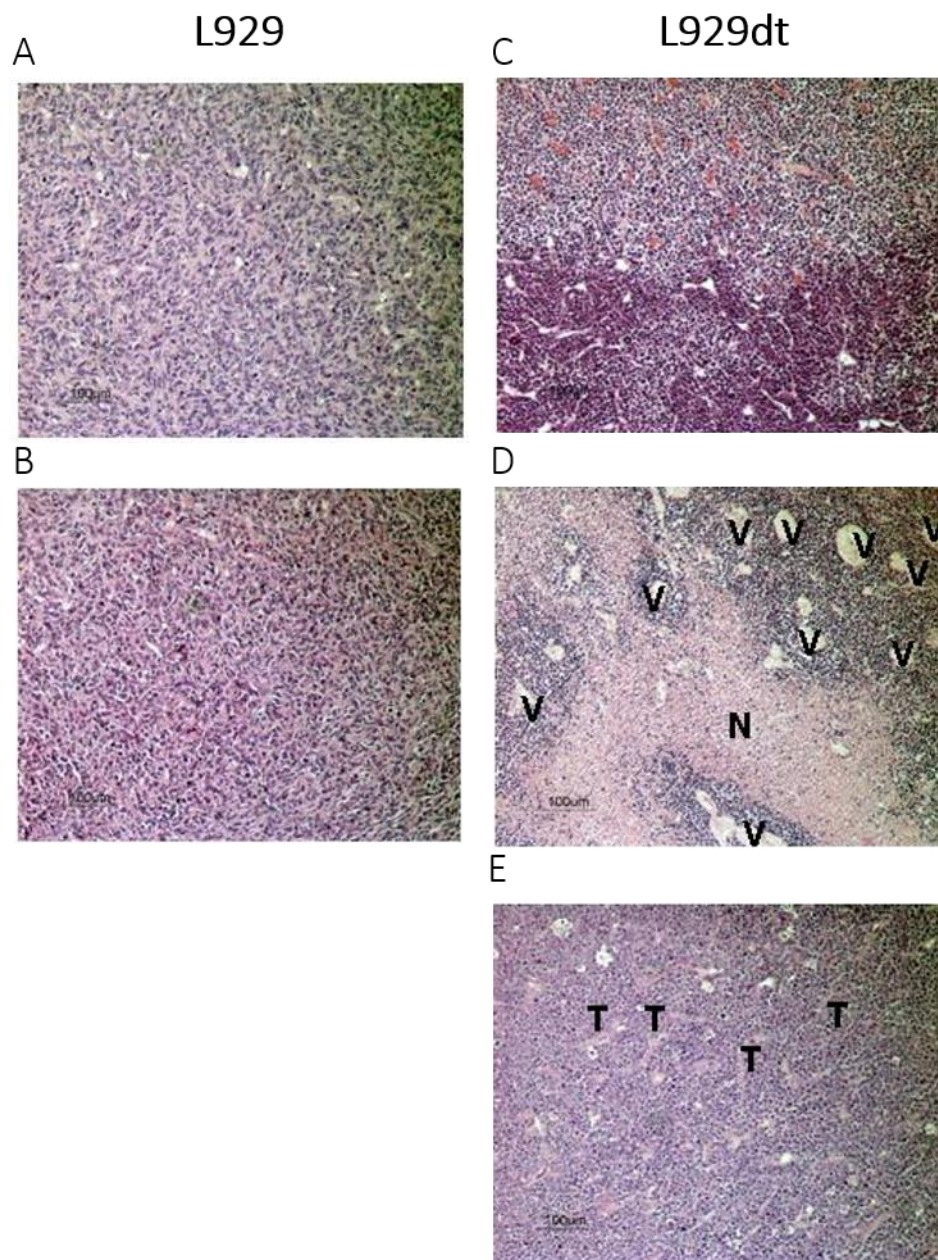


**Figura 4.39.** Tamaño y morfología de los tumores formados por las células L929 y L929dt en ratones atímicos. Se inyectaron  $10^6$  células de cada tipo subcutáneamente en los ratones y se siguió la evolución de los tumores. A día 21, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los tumores y se pesaron. El gráfico en (A) representa la media  $\pm$  SD del tamaño de los tumores formados para cada línea celular con  $n=3$ . Las imágenes muestran de forma ilustrativa la morfología a nivel macroscópico de los tumores formados por las células: (B) L929; y (C) L929dt. \* $p<0.05$ .

En la *Figura 4.39* se muestran los resultados obtenidos a nivel macroscópico. Como se puede observar, las células L929dt fueron capaces de formar tumores significativamente mayores en estos ratones, en comparación con sus células parentales (*Figura 4.39A*). Además de esto, la morfología de los mismos también era distinta: mientras que los ratones inoculados con células L929 desarrollaron tumores formando una sola masa tumoral sólida (*Figura 4.39B*), aquellos inyectados con células L929dt desarrollaron tumores formados por varias masas sólidas en el punto de inoculación (*Figura 4.39C*). Además de esto, y a diferencia de lo observado con las masas procedentes de las células parentales, las procedentes de células L929dt parecían estar formadas por distintos tipos de tejido (*Figura 4.39C*).



Para confirmar estas observaciones a nivel macroscópico, se extrajeron fragmentos de estos tumores y se analizaron tras tinción con hematoxilina-eosina.



**Figura 4.40.** Análisis histológico de los tumores formados por las células L929 y L929dt en ratones atímicos. Una parte de los tumores del experimento mostrado en la *Fig. 4.39*, se extrajeron, se procesaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina para la observación histológica de los mismos. Las imágenes muestran las histologías de los tumores formados por las células: (A),(B) L929 y (C-E) L929dt. N: zona hipóxica/necrótica; V: vasos sanguíneos; T: estructuras trabeculares.

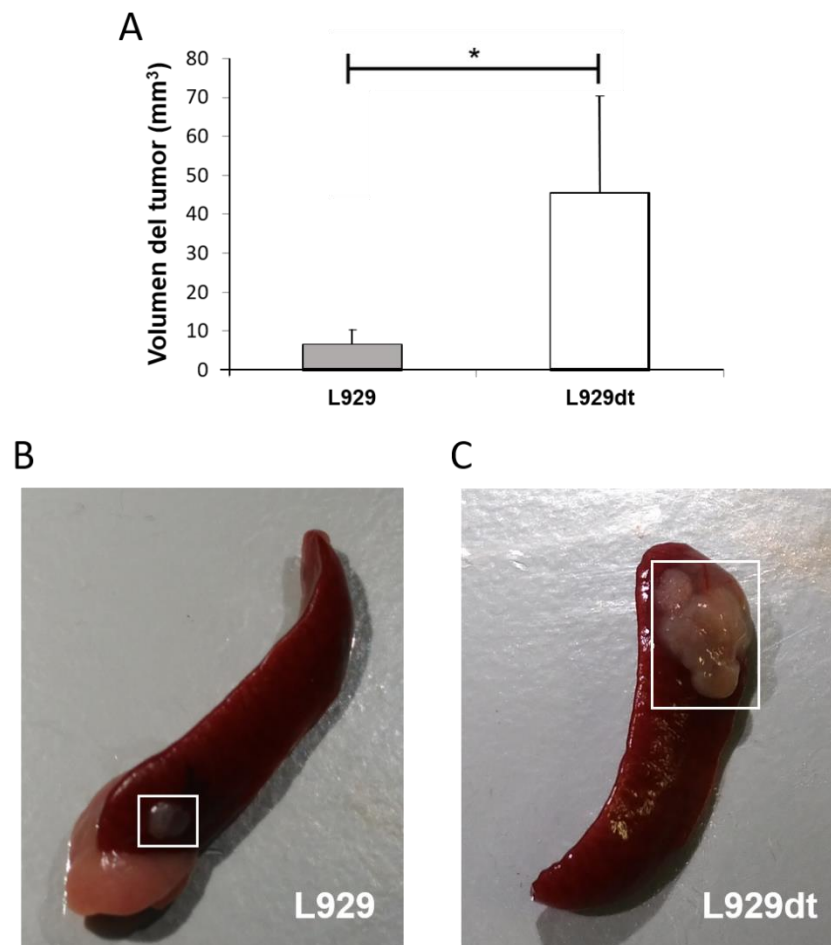
La histología de los tumores mostró la típica apariencia fibroblástica de las células L929, y la distinta morfología de las células L929dt, más pequeñas y redondeadas, en consonancia con la apariencia de ambas en cultivo (*Figura 4.40*). En ambos tipos de tumores, la organización de los tejidos es compacta, con una alta densidad celular, indicativo de una alta tasa de proliferación (*Figura 4.40A-C*). Sin embargo, en los tumores formados por las células L929dt se puede observar claramente la presencia de diferentes tipos de tejido compacto, con distinto nivel de tinción de hematoxilina-eosina (*Figura 4.40C*). Además, para estos tumores, se detectaron zonas menos teñidas, probablemente pertenecientes a partes internas del tumor, que podrían corresponder a zonas hipóxicas o necróticas (señalado con una “N”, ver *Figura 4.40D*). En varias partes de los tumores derivados de las células L929dt, y no en los formados por las células L929, se detectaron estructuras similares a vasos sanguíneos de gran diámetro, rodeados en todos los casos por una masa tumoral compacta (señalados con una “V”, ver *Figura 4.40D*). En último lugar, en los tumores formados por las células L929dt, a diferencia de los de las células L929, se aprecia que el tejido intersticial tiene una tendencia a organizarse en forma de pequeñas pero abundantes estructuras fibróticas elongadas y de tipo trabecular (señaladas con una “T”, ver *Figura 4.40E*).

#### **4.3.5 Capacidad tumorigénica de las células L929dt *in vivo* por inyección intraesplénica**

Los resultados expuestos en el apartado anterior demostraron que las células L929dt poseían una capacidad tumorigénica mayor que sus células de origen L929. Generalmente, la inyección subcutánea en ratones genera tumores locales que crecen de manera local, pero esta técnica no favorece la aparición de metástasis. Por ello, se propuso llevar a cabo un segundo experimento *in vivo* de crecimiento tumoral con ratones atímicos, inyectando las células tumorales de forma intraesplénica.

Para este experimento, se emplearon dos grupos de 5 ratones, a los que se les inyectaron  $1.25 \times 10^5$  células L929 o L929dt viables de forma intraesplénica. Adicionalmente, se emplearon ratones control, a los que se les inyectó PBS en el bazo. A las 3 semanas de inoculación, los ratones se sacrificaron, se extrajeron los bazos de los mismos y se pesaron.





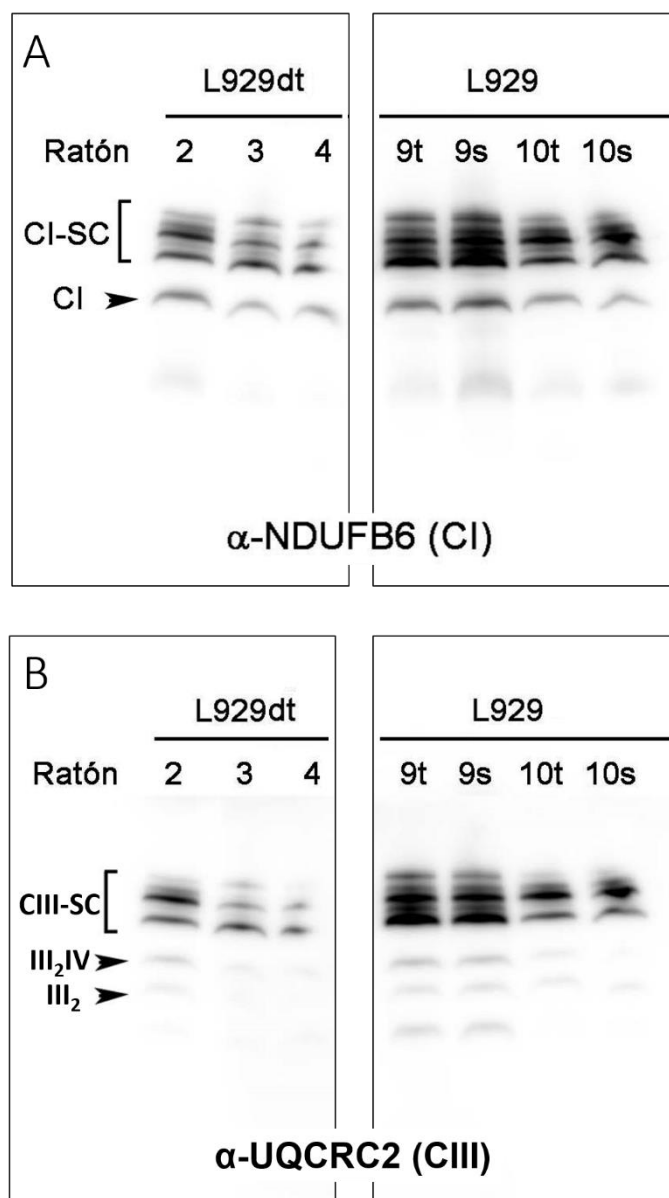
**Figura 4.41.** Volumen y morfología de los tumores formados por las células L929 y L929dt en ratones atímicos. Se inyectaron  $1.25 \times 10^5$  células viables de cada tipo de forma intraesplénica en los ratones. A día 21, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los bazo y se midió el volumen de los tumores formados. El gráfico en (A) representa la media  $\pm$  SD del volumen de los tumores formados para cada línea celular con  $n=5$ . Las imágenes muestran de forma ilustrativa la morfología a nivel macroscópico de los tumores formados en los bazo por las células: (B) L929; y (C) L929dt. \* $p<0.05$ .

De nuevo, y en consonancia con lo obtenido con los tumores generados por inyección subcutánea de las células tumorales, las células L929dt formaron tumores en el bazo de mayor volumen que aquellos formados por las L929 (*Figura 4.41A*). Adicionalmente, la morfología a nivel macroscópico de los tumores derivados de las células L929dt vuelven a tener una apariencia multilobulada, es decir, aparentemente formada por varias masas de tumor sólido (*Figura 4.41C*). En contraste, los formados por las células L929 sólo presentaron una masa tumoral sólida uniforme (*Figura 4.41B*).

Asimismo, se examinaron macroscópicamente los órganos colindantes al bazo para la posible detección de metástasis y se extrajeron los hígados en algunos casos. Sin embargo, en estas condiciones experimentales, no pudo detectarse la presencia de metástasis en ninguno de los órganos analizados.

Además de todo esto, se quiso comprobar si los tumores derivados de las células L929dt conservaban las deficiencias en la cadena respiratoria y en la formación de SC's de la línea celular en cultivo. Así pues, otra parte de los tumores formados en los bazo se destinó al análisis del ensamblaje de SC's. Las muestras se procesaron y se obtuvieron los homogenados tisulares tal y como se describe en el *Apartado 3.9.3*, y se aislaron las mitocondrias a partir de ellos. Seguidamente, se separaron las proteínas que contienen por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida BN. Parte de estos geles se destinaron a medir las actividades de los complejos I y IV en gel, mientras que otros se transfirieron a una membrana y se realizaron inmunoblots para las proteínas de interés.

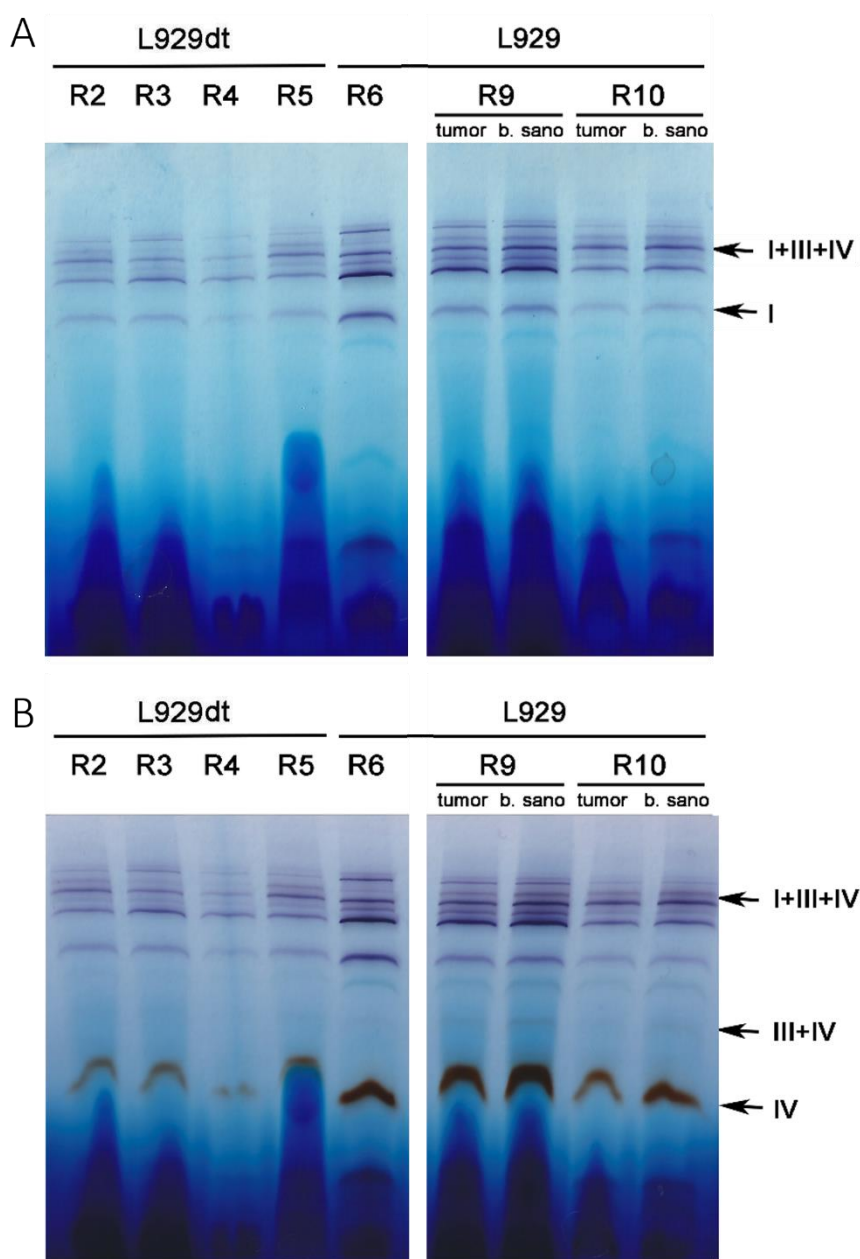
En la *Figura 4.42* se muestran los inmunoblots realizados para los complejos I y III de la mETC en varios de los tumores formados por las células L929 y L929dt. Se puede observar que el patrón de complejos y SC's es distinto para los tumores formados a partir de estas dos líneas celulares, tanto para el C.I (*Figura 4.42A*) como para el C.III (*Figura 4.42B*). En general, los tumores formados por las células L929dt poseen proporcionalmente una mayor cantidad de C.I libre en comparación con los SC's que lo contienen (CI-SC), mientras que en los tumores formados por las células L929 existe una mayor proporción de C.I asociado a SC's, disminuyendo así la cantidad de C.I en ellos (*Figura 4.42A*). Es interesante destacar que este patrón de SC's en los tumores formados por las células L929 se asemeja más al encontrado en tejido sano de los bazo (señalado con una "s" en la *Figura 4.42*). Respecto al C.III, también puede apreciarse una mayor proporción de C.III libre en los tumores formados por las células L929dt (respecto a CIII-SC), en comparación con la cantidad de C.III libre en los de las células L929 (*Figura 4.42B*). En su conjunto, el patrón de bandas de los complejos y SC's medidos sigue la tendencia observada en estudios anteriores con las dos líneas celulares en cultivo (*Figura 2.1C*), confirmando así el mantenimiento de este comportamiento en los tumores formados *in vivo*.



**Figura 4.42.** Western-Blotting de los complejos: (A) I ( $\alpha$ -NDUFB6) y (B) III ( $\alpha$ -UQCRC2) de los tumores derivados de las células L929 y L929dt. Se extrajeron las mitocondrias de los tumores formados por las dos líneas celulares tras inyección intraesplénica en ratones atímicos. Seguidamente, se realizó una electroforesis BN, se transfirieron las proteínas separadas a una membrana y se llevaron a cabo los inmunoblots. t: fracción tumoral del bazo; s: fracción sana del bazo.

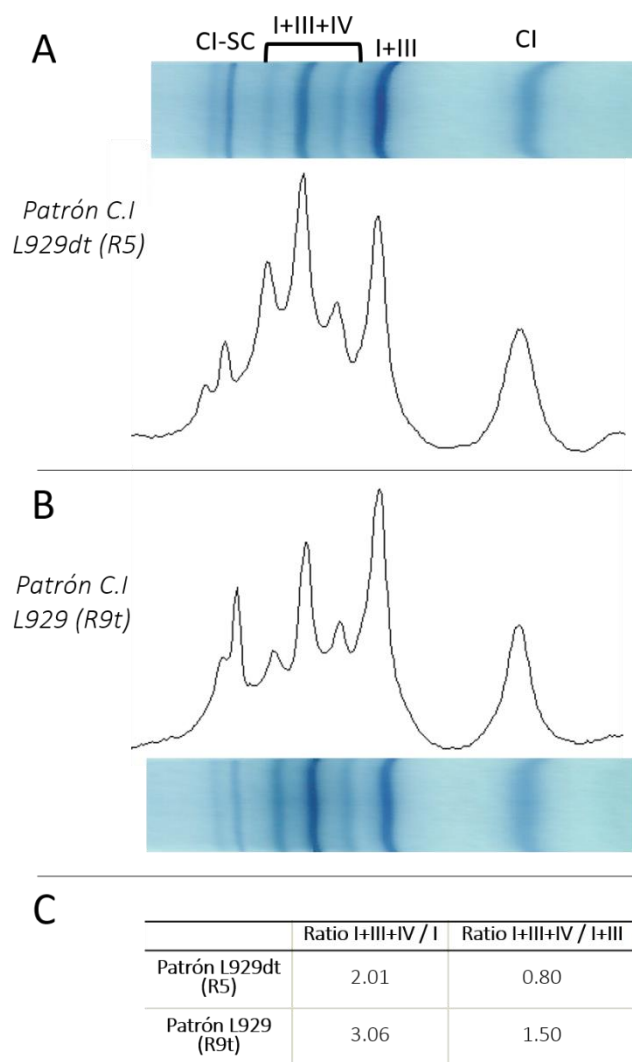
Además de esto, también se realizaron en paralelo otras electroforesis BN con el objetivo de evaluar la actividad de los complejos I y IV en gel. En la *Figura 4.43* se recogen los resultados. Por lo general, se puede visualizar un menor número de bandas asociadas a SC's, del C.I y del C.IV, en los tumores formados por las células L929dt respecto a los de las células L929 (*Figura 4.43*). Además de esto, y al igual que lo detectado en los inmunoblots, parece haber una mayor proporción de C.I libre respecto a CI-SC en las células L929dt que en las células L929 (*Figura 4.43A*). Para poder observar esto con mayor precisión, se realizaron densitometrías de la

actividad C.I en gel de un tumor de cada tipo y se analizaron los ratios intrabandas de ellos (*Figura 4.44*).



**Figura 4.43.** Actividad de los complejos: (A) I y (B) IV en gel de los tumores derivados de las células L929 y L929dt. Se aislaron las mitocondrias de los tumores formados por las células L929 y L929dt en ratones atímicos por inyección intraesplénica. Seguidamente, se llevó a cabo una electroforesis BN y se añadieron los tampones correspondientes para la aparición de los precipitados en las bandas, correspondientes a los sitios de mayor o menor actividad de cada complejo analizado.

El análisis por densitometría de las bandas aparecidas en los tumores de las células L929dt (R5, *Figura 4.44A*) revela un patrón distinto al encontrado en los de las células L929 (R9t, *Figura 4.44B*). La comparación de las bandas de cada muestra entre sí revela, por una parte, que el ratio de intensidad del SC I+III+IV/I es más reducido para el tumor L929dt que para el L929 (*Figura 4.44C*), confirmando la mayor proporción de C.I en los tumores L929dt.



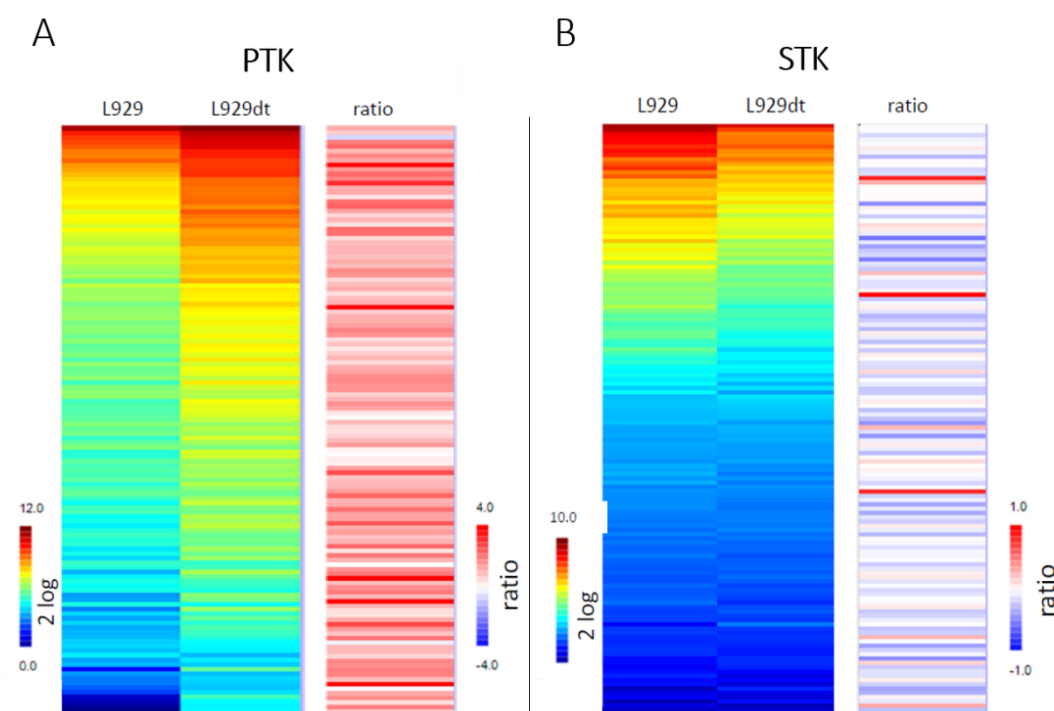
**Figura 4.44.** Densitometría de las actividades del C.I en gel de tumores derivados de las células: (A) L929dt (R5) y (B) L929 (R9t). Las intensidades de las bandas aparecidas se normalizaron y compararon entre sí, dentro de la misma muestra. En (C) se exponen los ratios obtenidos de las comparaciones intrabanda de las muestras.

Adicionalmente, el ratio de I+III+IV/I+III indica una mayor proporción del SC I+III respecto al I+III+IV en el tumor L929dt que en el tumor L929 (*Figura 4.44C*). Considerando los resultados anteriores (*Figura 2.1*), esto indicaría una mayor dificultad del C.I de las células L929dt de asociarse al respirasoma (SC I+III+IV) que al C.III en solitario, en comparación con el tumor L929.

#### 4.3.6 Análisis comparado del quínoma de las células L929 y L929dt

Con el objetivo de caracterizar las vías de transducción de señal que pudieran estar afectadas en las células L929dt en comparación con las parentales L929, se decidió estudiar el quínoma de ambas células. Para poder realizar este ensayo, se contrató el servicio de la empresa PamGene International B.V. (Hertogenbosch, Países Bajos), que poseen la tecnología adecuada para realizar este ensayo (ver *Apartado 3.8*).

Se enviaron lisados celulares de las dos líneas celulares a la empresa, donde se analizaron las actividades de las PTK y las STK. Brevemente, el experimento consistió en mezclar los extractos celulares con una colección de péptidos inmovilizados que contenían los sitios de fosforilación de las quinasas, mimetizando así a los sustratos de las mismas. Tras la fosforilación, se añadieron anticuerpos marcados con un fluoróforo que reconocían los sitios de fosforilación. Finalmente, la intensidad de fluorescencia fue medida y comparada entre las líneas celulares.



**Figura 4.45.** Resultados del análisis del quinoma comparado entre las células L929 y L929dt. Cada sustrato medido viene representado en cada fila observada de las primeras dos columnas de cada apartado, donde los resultados vienen expresados por una paleta de colores en una escala logarítmica. En la tercera columna, se representa el ratio L929dt vs L929 de intensidad de cada sustrato como un mapa de calor. (A) Sustratos de las PTK; (B) Sustratos de las STK.

Este ensayo permitió medir la fosforilación de 126 sustratos para las PTK y 136 para las STK. Los resultados generales revelaron un aumento muy significativo de la actividad de las PTK en las células L929dt (*Figura 4.45A*) y una reducción sistemática de la actividad de las STK (*Figura 4.45A*) respecto a las células parentales. En los resultados del análisis se pudo observar un aumento drástico de la activación de diversas vías dependientes de PTK (*Figura 4.46A*), de entre las cuales puede destacar la ruta de señalización del EGFR (*Figura 4.46B*).



#### 4.3.7 Generación de los híbridos $dt^{L929}$ y $L929^{dt}$

Las células  $L929^{dt}$  poseen características muy particulares y diferenciadas a sus células parentales, tales como el crecimiento en suspensión en la placa de cultivo, una menor capacidad respiratoria y una mayor tumorigenicidad, entre otros (Catalán et al., 2015; Marco, 2015) (*Figura 4.39*). A nivel genómico, las células  $L929^{dt}$  poseen dos mutaciones en la subunidad ND2 del C.I del mtDNA (*Figura 4.37*). Se planteó la posibilidad de caracterizar si estas mutaciones pudieran ser las responsables del fenotipo altamente tumorigénico de estas células. Para ello, se llevó a cabo la transferencia de las mitocondrias de una línea celular a la otra, y viceversa. Este intercambio de mitocondrias de uno a otro contexto nuclear supuso la generación de varias líneas celulares derivadas de sus parentales, o *híbridos transmitocondriales*. Para este ensayo, se generaron dos líneas de híbridos (ver *Figura 3.2*):

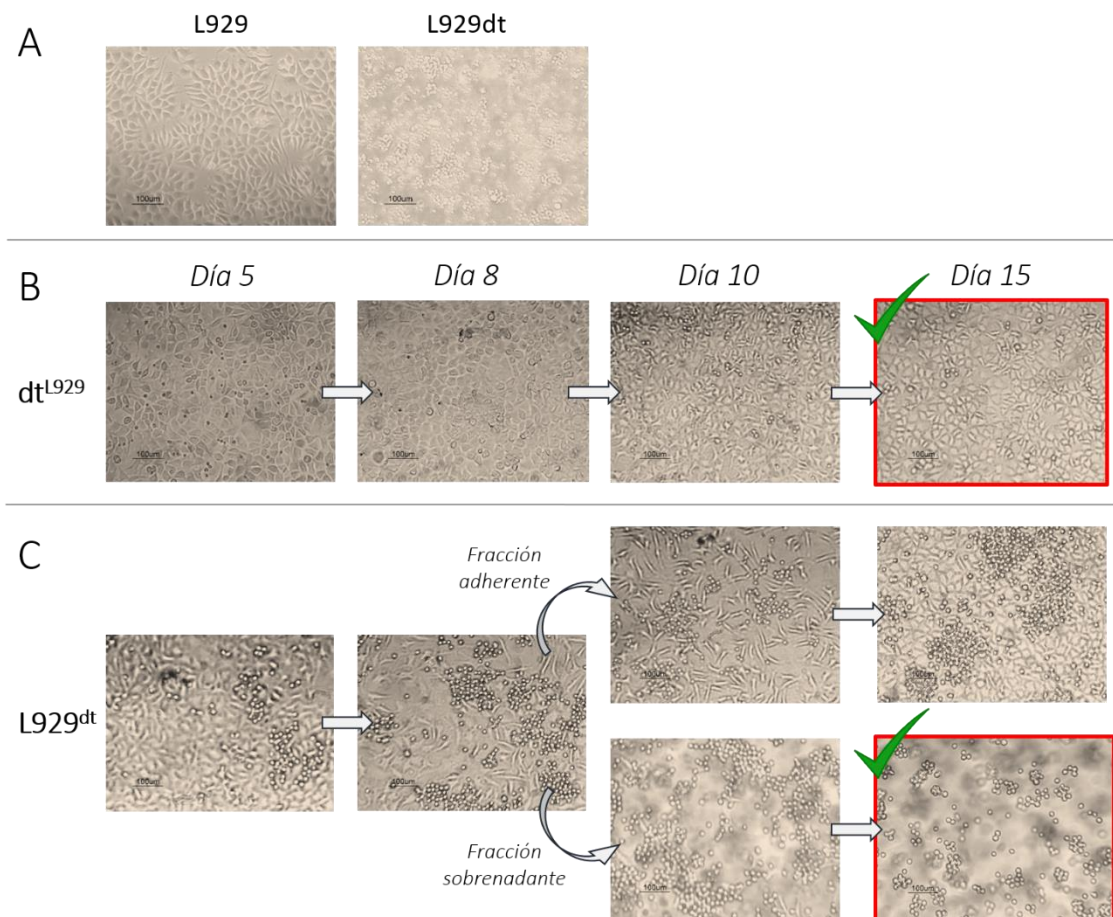
- **$L929^{dt}$** : De núcleo  $L929$  y mitocondrias de las células  $L929^{dt}$ .
- **$dt^{L929}$** : De núcleo  $L929^{dt}$  y mitocondrias de las células  $L929$ .

La metodología para generar cada uno de estas sub-líneas se recoge en el *Apartado 3.3*. Brevemente, para la formación de las células  $L929^{dt}$ , se aislaron las mitocondrias de las células  $L929^{dt}$  y se fusionaron en PEG con las células  $L929-p^0$  (carentes de mtDNA). Para la formación de las células  $dt^{L929}$ , se trataron las células  $L929^{dt}$  con R6G para la eliminación de sus mitocondrias, se enuclearon las células  $L929$  y los productos de ambas se fusionaron en PEG.

La selección de los híbridos recién formados siguió una metodología que también se recoge en el *Apartado 3.3*. Brevemente, tanto las células donadoras de mitocondrias como las tratadas con R6G son incapaces de vivir en medio DMEM completo sin suplemento de uridina. Respecto a las células  $L929$  enucleadas, se sembraron y se verificó que no crecían en cultivo, demostrando así la eficiencia de la enucleación. Por último, aquellas células que hayan adquirido correctamente las mitocondrias durante la fusión deben ser capaces de sobrevivir en medio DMEM completo sin uridina.

En la *Figura 4.47* se encuentran recogidas la apariencia a través del microscopio óptico de las células parentales y de los híbridos generados. Sorprendentemente, la morfología de las células donadoras de núcleo cambió para ambos casos cuando se fusionaron con las mitocondrias de la otra célula parental. Por una parte, durante la selección de las células  $dt^{L929}$ , al adquirir las células  $L929^{dt}$  tratadas con R6G las mitocondrias de las células  $L929$ , pasaron de crecer en suspensión a recuperar las señales de adhesión y crecer en la superficie de la placa, con la apariencia fibroblástica típica de las células  $L929$  a los pocos días (*Figura 4.47B*).

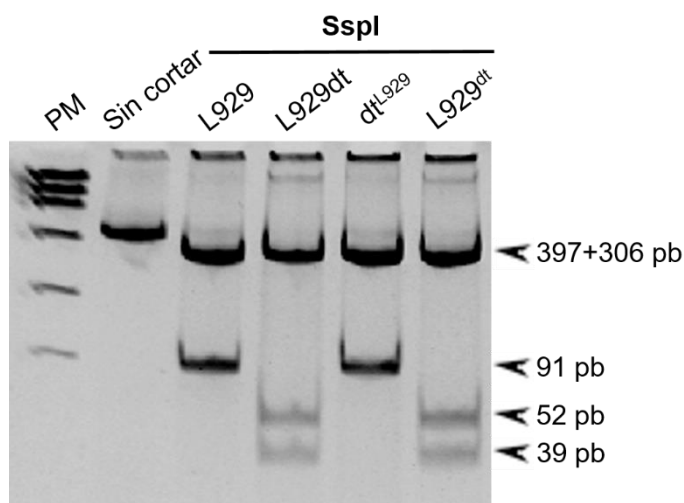




**Figura 4.47.** Apariencia de los cíbridos formados a partir de las células L929 y L929dt. La formación de los cíbridos transmitocondriales, a partir de las células L929 y L929dt, se realizó al día 0. Las imágenes muestran la apariencia al microscopio óptico de las (A) Células L929 y L929dt; y de la evolución cronológica de la morfología de los cíbridos (B) dt<sup>L929</sup> y (C) L929dt.

Por otra parte, las células L929<sup>dt</sup> sufrieron el proceso opuesto. Cuando las células L929- $\rho^0$ , que crecen adheridas de forma similar a las células L929, se fusionaron con las mitocondrias de las células L929dt, comenzaron a experimentar un proceso de desadherencia progresivo (Figura 4.47C). Ocho días después de la fusión, se decidió fraccionar el cultivo existente entre aquellas células despegadas y aquellas que se mantenían adheridas. Las células del sobrenadante se mantuvieron despegadas, creciendo con una alta tasa proliferativa y presentando una apariencia redondeada similar a las células L929dt (Figura 4.47C), generando finalmente las células L929<sup>dt</sup>. Respecto a la fracción adherente, se siguió manteniendo varios días, en los que se pudo seguir observando una tendencia a despegarse de la placa de cultivo (Figura 4.47C).

Para confirmar a nivel genómico el éxito de la transferencia de mitocondrias de un contexto nuclear al otro, se procedió a secuenciar el gen de la subunidad ND2 en las nuevas líneas celulares y la presencia de las variantes características de cada mtDNA se confirmó por RFLP. El mtDNA de interés se amplificó por PCR, se digirió con la enzima SspI y se separaron los fragmentos obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v).



**Figura 4.48.** Verificación de fusión mitocondrial de los híbridos transmitocondriales de L929 y L929dt por RFLP. El fragmento de mtDNA de interés se amplificó por PCR, se digirió con la enzima de restricción SspI y los productos obtenidos separaron en un gel de poliacrilamida al 10% (p/v).

La RFLP reveló, por una parte, la aparición de dos fragmentos de DNA de 39 y 52 pares de bases para las células L929<sup>dt</sup>, indicativo de la presencia de mitocondrias provenientes de las células L929dt en las mismas (Figura 4.48). Por la otra parte, en las células dt<sup>L929</sup>, la enzima de restricción SspI no actuó, dejando sin cortar el fragmento de 91 pares de bases, siendo éste del mismo peso que las aparecidas en las células L929 y confirmando la introducción de sus mitocondrias en estos híbridos (Figura 4.48).

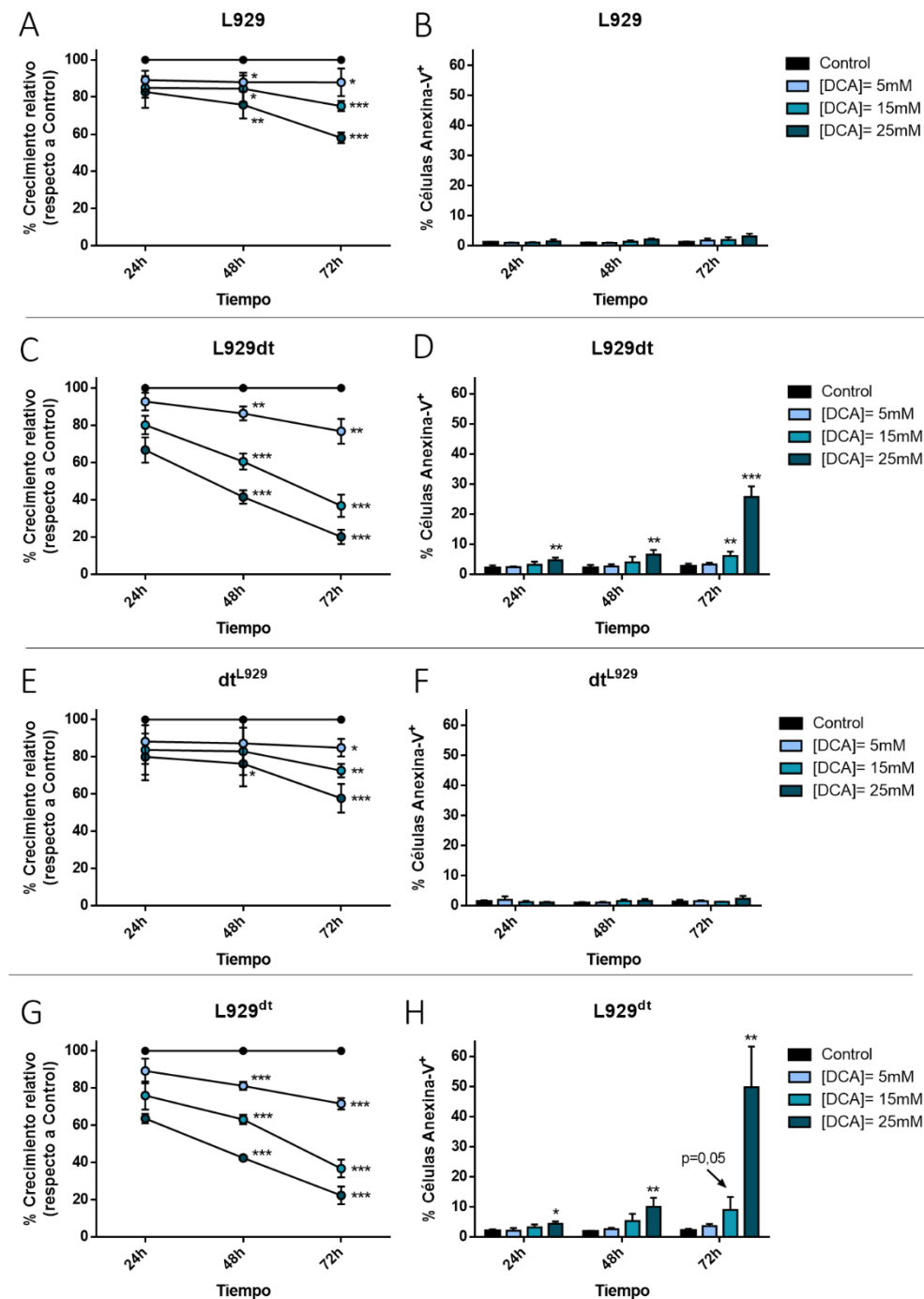
#### 4.3.8 Caracterización de los híbridos dt<sup>L929</sup> y L929<sup>dt</sup>

Una vez que se hubieron generado con éxito los híbridos transmitocondriales de las líneas celulares L929 y L929dt, se quiso caracterizar el fenotipo de estas nuevas sub-líneas.

##### 4.3.8.1 Sensibilidad a DCA

En estudios anteriores, nuestro grupo demostró que, a diferencia de las células parentales, las células L929dt eran muy sensibles a la acción del fármaco DCA (Catalán et al., 2015), el cual fuerza a las células a realizar la vía OXPHOS. Dado que es un fármaco que actúa en la mitocondria, se evaluó la sensibilidad de los híbridos formados a este fármaco. Las células se sembraron a 6000 células/cm<sup>2</sup> (para las adherentes) o a 3x10<sup>5</sup> células/ml (para las no adherentes) y se llevó a cabo una dosis-respuesta con DCA a 5-25 mM durante 24-72 horas. Tras el tiempo de

incubación correspondiente, se evaluó el crecimiento celular por MTT y la muerte celular por marcaje con anexina-V y análisis por citometría de flujo.



**Figura 4.49.** Sensibilidad de las células L929 y sus derivadas al DCA. Las células se incubaron durante 24-72 horas con DCA (5-25 mM). Seguidamente, el efecto sobre el crecimiento se evaluó por MTT [(A),(C),(E),(G)] y la muerte celular por marcaje con anexina-V y análisis por citometría de flujo [(B),(D),(F),(H)]. Las células empleadas son: (A),(B) L929; (C),(D) L929dt; (E),(F) dtL929; y (G),(H) L929<sup>dt</sup>. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SD de n=3. \*p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

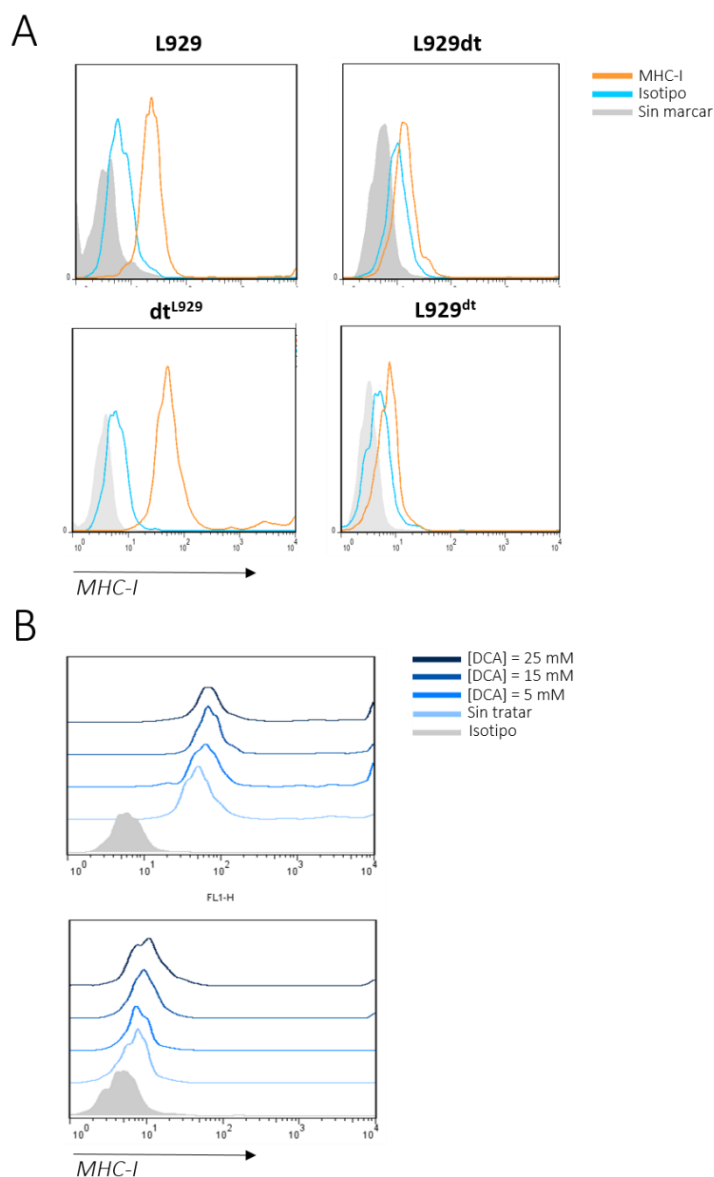
Los resultados señalan que, efectivamente, aquellas células que portan las mutaciones en ND2 en la mitocondria, son mucho más sensibles a la acción del DCA que aquellas que no las tienen (*Figura 4.49*). Por una parte, los cíbridos dt<sup>L929</sup>, al adquirir las mitocondrias de las células L929, se vuelven resistentes a la muerte inducida por el DCA (*Figura 4.49F*), afectándoles de manera moderada en el crecimiento (*Figura 4.49E*), comportándose de forma similar a la de las células L929 (*Figura 4.49A,B*). Por otra parte, el traspaso de mitocondrias L929dt a los cíbridos L929<sup>dt</sup> les provocó un aumento muy significativo en la sensibilidad al DCA, tanto en la apoptosis como en la inhibición del crecimiento (*Figura 4.49G,H*), siguiendo la misma sensibilidad observada en las células L929dt (*Figura 4.49C,D*).

#### **4.3.8.2 Expresión de MHC-I**

Otro de los aspectos a explorar en estas líneas celulares es la expresión del MHC-I. Como se observó en estudios anteriores, las células L929dt, en el proceso de desadherencia, además de volverse sensibles al DCA, perdieron la expresión del MHC-I (Catalán et al., 2015). No sólo eso, sino que además esta pérdida del MHC-I podía ser parcialmente restaurada por el tratamiento con DCA (Marco, 2015). Así pues, la expresión basal de MHC-I de las cuatro líneas celulares de interés fue analizada por citometría de flujo. Además de esto, los cíbridos dt<sup>L929</sup> y L929<sup>dt</sup> se incubaron de la misma forma que en el apartado anterior durante 72 horas con DCA (5-25 mM) y se analizaron asimismo los cambios en la expresión del MHC-I en las células viables.

La expresión basal del MHC-I en superficie de los cíbridos refleja de nuevo que siguen la misma tendencia que las parentales (*Figura 4.50*), en función de las mitocondrias que poseen: los cíbridos dt<sup>L929</sup> recuperaron la expresión de MHC-I en superficie, siendo de hecho mayor que la observada en las células L929 en este ensayo (*Figura 4.50A*), y en los cíbridos L929<sup>dt</sup> los niveles de MHC-I prácticamente desaparecieron, mimetizando a las células L929dt (*Figura 4.50A*).

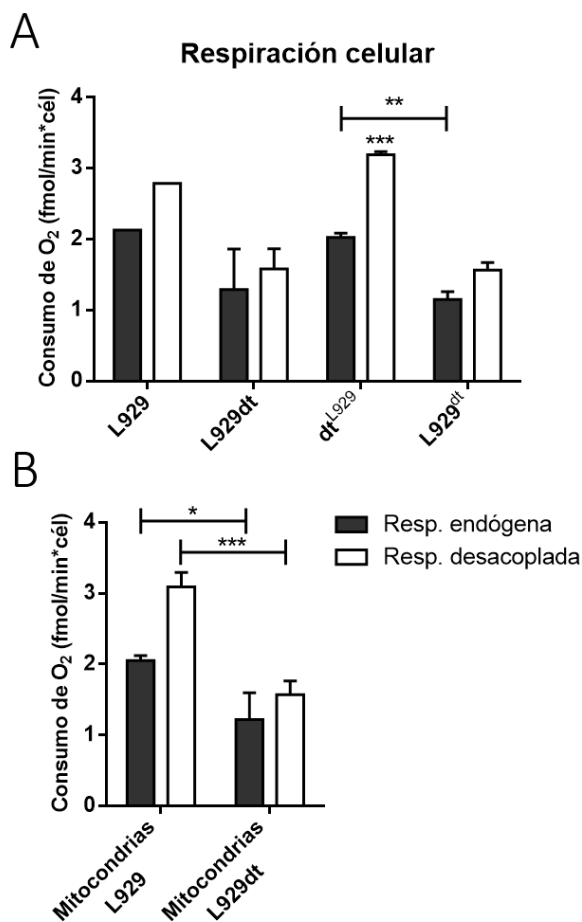
Respecto a la expresión del MHC-I en los cíbridos tras incubación con DCA, se puede detectar que los niveles de esta proteína aumentaron de una forma dosis-dependiente en ambas líneas celulares (*Figura 4.50B*), en consonancia con lo observado en las células L929 y L929dt (Marco, 2015).



**Figura 4.50.** Expresión del MHC-I de las células L929 y derivadas. (A) Expresión basal del MHC-I en superficie de las células L929, L929dt, dt<sup>L929</sup> y L929<sup>dt</sup>. (B) Expresión del MHC-I en superficie de las células dt<sup>L929</sup> y L929<sup>dt</sup> tras incubación durante 72 horas con DCA (5-25 mM).

#### 4.3.8.3 Capacidad respiratoria

Los defectos encontrados en la mitocondria de las células L929dt les impide realizar la vía OXPHOS de manera óptima, disminuyendo así su capacidad respiratoria respecto a las células L929 (Marco, 2015) (ver *Figura 2.1A*). Por tanto, sería esperable que los híbridos formados compartieran la misma capacidad respiratoria que las células de cuyas mitocondrias provienen. Para realizar las mediciones, se empleó un electrodo tipo Clark termostatzado a 37°C, tal como se describe en el *Apartado 3.6*. Para medir la capacidad respiratoria máxima o desacoplada, se hizo uso de un agente desacoplante (dinitrofenol).

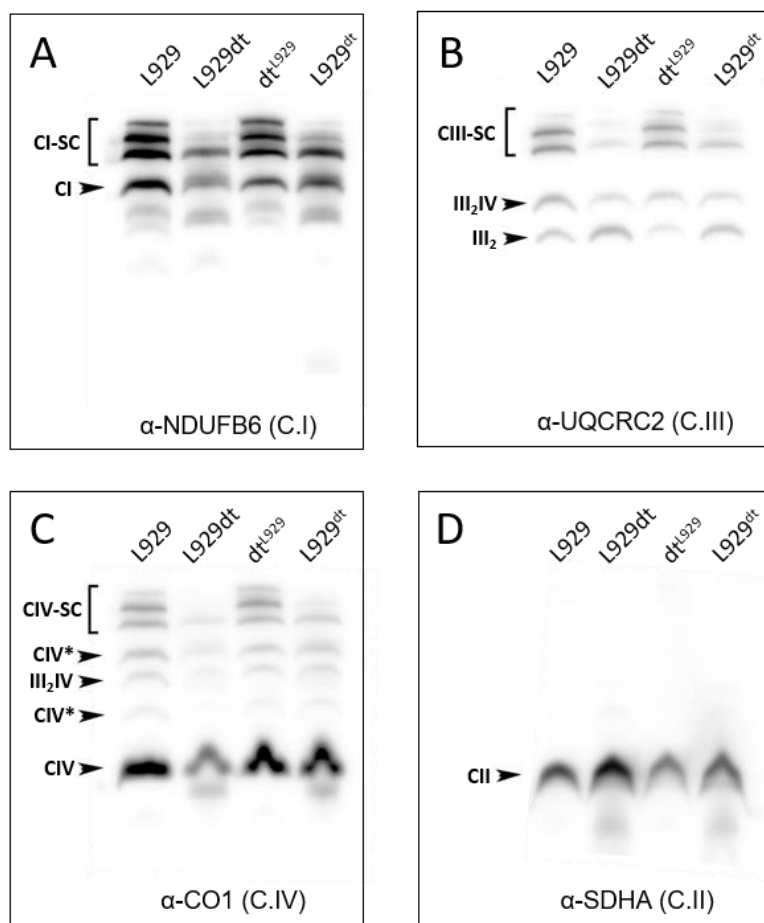


**Figura 4.51.** Consumo de oxígeno endógeno y desacoplado en las líneas celulares L929, L929dt, dt<sup>L929</sup> y L929<sup>dt</sup>. Las medidas se realizaron con células vivas en un electrodo tipo Clark termostatzado a 37°C. Los datos se muestran separados por línea celular en (A) y agrupados por el tipo de mitocondrias que contienen, en (B). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SD de n=3 o n=1 para las células L929. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Tal y como se observa en la *Figura 4.51*, los cíbridos que adquirieron las mitocondrias de las células L929 (dt<sup>L929</sup>) recuperaron la capacidad respiratoria de las células L929 originales, tanto a nivel basal como al máximo rendimiento (*Figura 4.51A*). De la misma forma, las células L929<sup>dt</sup>, al incorporar las mitocondrias L929dt, disminuyeron su consumo de oxígeno y perdieron parcialmente su capacidad respiratoria (*Figura 4.51A*). Si se comparan los datos agrupando las células con mitocondrias de origen L929 o L929dt, puede observarse claramente las diferencias significativas entre un fenotipo o el otro (*Figura 4.51B*).

#### 4.3.8.4 Organización de los SC's

Como ya se ha visto en estudios anteriores, las células L929dt poseen una deficiencia en la formación de SC's, especialmente en los que contienen el C.I (ver *Figura 2.1C*). Los patrones de bandas de este complejo encontrados en los tumores que forman estas células confirman esta tendencia (*Figura 4.42A*), siendo las mutaciones encontradas en la subunidad ND2 (*Figura 4.37*) las posibles causantes de este fenómeno. En consecuencia, se evaluó la expresión de los complejos y SC's I-IV de la mETC en las líneas parentales y en los híbridos formados.

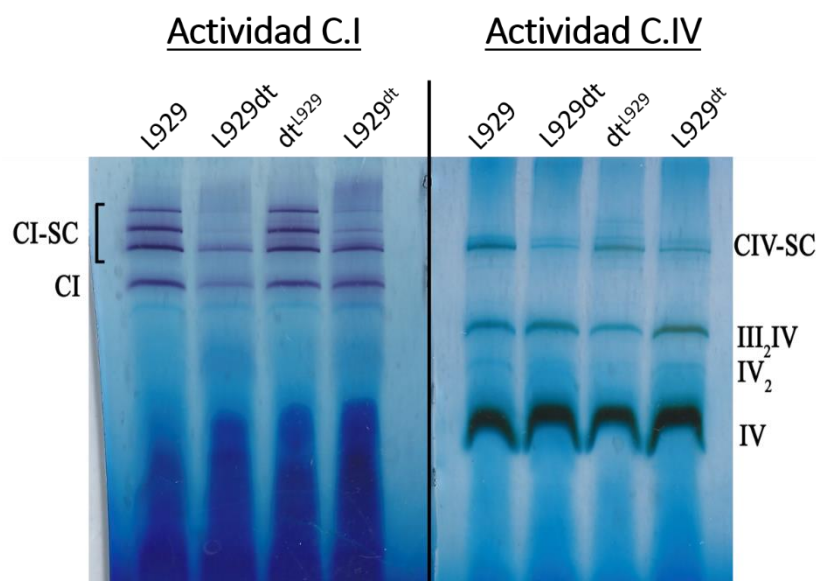


**Figura 4.52.** Western-Blotting de los complejos: (A) I ( $\alpha$ -NDUFB6); (B) III ( $\alpha$ -UQCRC2); (C) IV ( $\alpha$ -CO1); y (D) II ( $\alpha$ -SDHA) de las células L929, L929dt, dt<sup>L929</sup> y L929<sup>dt</sup>. Se extrajeron las mitocondrias de las 4 líneas celulares. Seguidamente, se realizó una electroforesis BN, se transfirieron las proteínas separadas a una membrana y se llevaron a cabo los inmunoblots. \*Bandas inespecíficas.

En consonancia con lo ya observado tanto para las células L929dt (*Figura 2.1C*) como para los tumores formados por las mismas (*Figura 4.42*), se puede apreciar que tanto las células L929dt como los híbridos L929<sup>dt</sup> forman una menor cantidad de SC's asociados al C.I en comparación con las células parentales o los híbridos dt<sup>L929</sup> (*Figura 4.52A*). Esta menor capacidad del C.I para ensamblarse con el resto de complejos en las células con mitocondrias L929dt provoca, en consecuencia, que haya una mayor proporción de C.I libre en ellas (*Figura 4.52A*). Esto puede apreciarse también en la *Figura 4.52B*, donde el C.III no tiene problemas en asociarse con el C.IV, pero sí con el C.I (CIII-SC), disminuyendo la intensidad de las bandas de esos SC's en las células L929dt y L929<sup>dt</sup>. No ocurre lo mismo en las células con mitocondrias L929, donde se puede

detectar tanto para el Western-Blot del C.I como del C.III y del C.IV una mayor cantidad de bandas de estructuras supramoleculares y con distinta proporción respecto a los complejos en forma libre (*Figura 4.52*).

Además de la expresión, se quiso estudiar también la actividad de los complejos I y IV en gel. Para ello, se separaron de nuevo las proteínas de los extractos mitocondriales por electroforesis BN y se incubaron los geles obtenidos con los reactivos necesarios para la aparición de las bandas (ver *Apartado 3.2.6*).



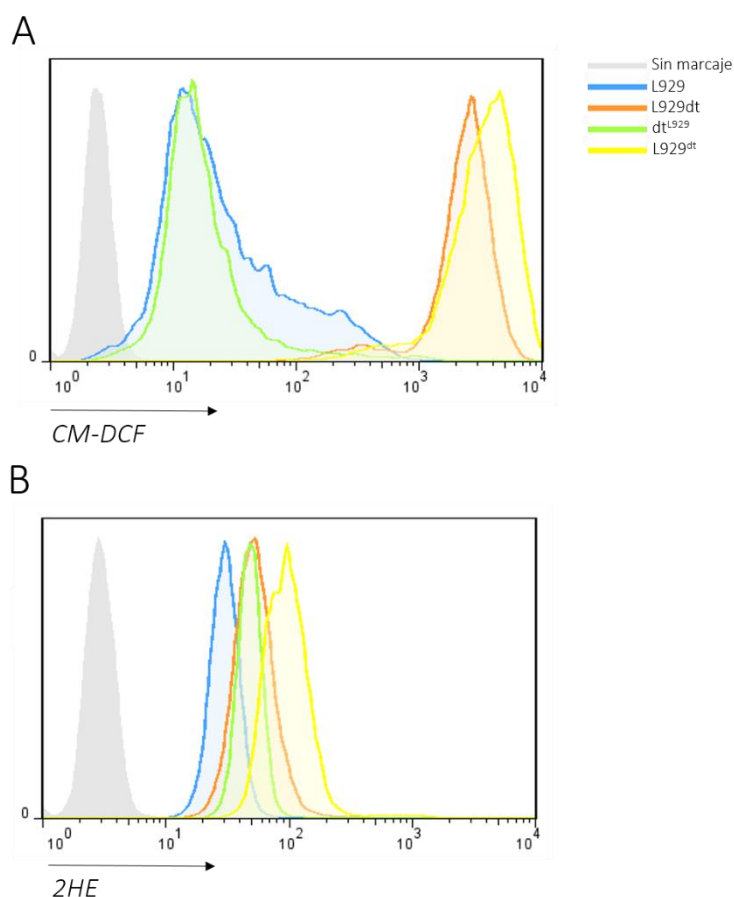
**Figura 4.53.** Actividad de los complejos I y IV en gel de las células L929, L929dt, dt<sup>L929</sup> y L929<sup>dt</sup>. Se extrajeron las mitocondrias de las 4 líneas celulares. Seguidamente, se realizó una electroforesis BN y se añadieron los tampones correspondientes para la aparición de los precipitados en las bandas, correspondientes a los sitios de mayor o menor actividad de cada complejo analizado.

En la *Figura 4.53* se recogen los resultados. De manera similar a lo detectado en los inmunoblots, las células L929dt y L929<sup>dt</sup> presentan un patrón de bandas distinto a las células con mitocondrias L929 para la actividad del C.I en gel, con una menor aparición de bandas del C.I cuando se asocia con otros complejos (*Figura 4.53*). Respecto a la actividad del C.IV, también se observa cómo la menor cantidad del C.I asociado al C.IV en las células L929dt y L929<sup>dt</sup> repercute en una disminución de la actividad de estos SC's respecto a la forma libre, mientras que para las células L929 y dt<sup>L929</sup>, las actividades se mostraron igualadas para la forma libre y la asociada a SC's (*Figura 4.53A*).



#### 4.3.8.5 Formación de ROS

Otro paso más en la caracterización de los cíbridos formados es la medición de la producción basal de ROS. Para llevarlo a cabo, se emplearon los compuestos: CM-DCFDA, que permite detectar la cantidad de ROS en general (mayoritariamente  $H_2O_2$ ), y DHE, que mide los niveles de  $O_2^-$  tras convertirse en 2HE. Se recogieron  $10^5$  células L929, L929dt,  $dt^{L929}$  o L929<sup>dt</sup> y se incubaron durante 30 minutos en presencia de una u otra sonda (2  $\mu$ M) a 37°C. Después, las células se lavaron una vez y la fluorescencia emitida se analizó por citometría de flujo.

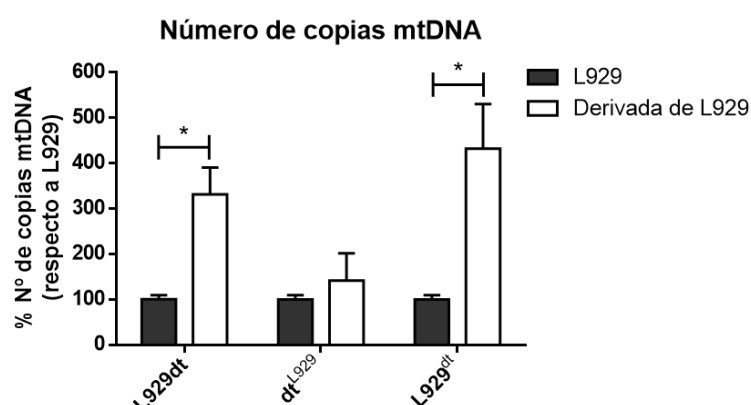


**Figura 4.54.** Formación de ROS de las células L929, L929dt,  $dt^{L929}$  y L929<sup>dt</sup> en estado basal, analizado mediante citometría de flujo. (A) Detección de ROS generales por aparición de CM-DCF. (B) Detección de  $O_2^-$  por aparición de 2HE.

Como puede observarse en la *Figura 4.54A*, las células con mitocondrias L929dt generan un ROS basal mayor respecto a las células con mitocondrias L929, concordando con lo observado en estudios anteriores (ver *Figura 2.1D*). Además de esto, se detectó un aumento en la producción de  $O_2^-$  para los cíbridos L929<sup>dt</sup> en comparación con el resto de células, y unos niveles comparables en los cíbridos  $dt^{L929}$  respecto a las células L929dt y L929 (*Figura 4.54B*), de forma similar a lo observado entre las células L929 y L929dt (*Figura 2.1D*).

#### 4.3.8.6 Número de copias del mtDNA

Uno de los defectos que se pueden encontrar en las mitocondrias de las células tumorales es una variación del número de copias del genoma mitocondrial (Hsu et al., 2016). Es por ello que se quiso analizar si los defectos encontrados en las mitocondrias de las células L929dt afectaban al número de copias del mtDNA. Para ello, se realizó una qPCR, a partir de DNA genómico, tal como se indica en los *Apartados 3.4.6 y 3.4.7*. Como gen mitocondrial de referencia, se escogió la subunidad Co2 del C.IV y se normalizó con la subunidad SDHA del C.II como gen nuclear.

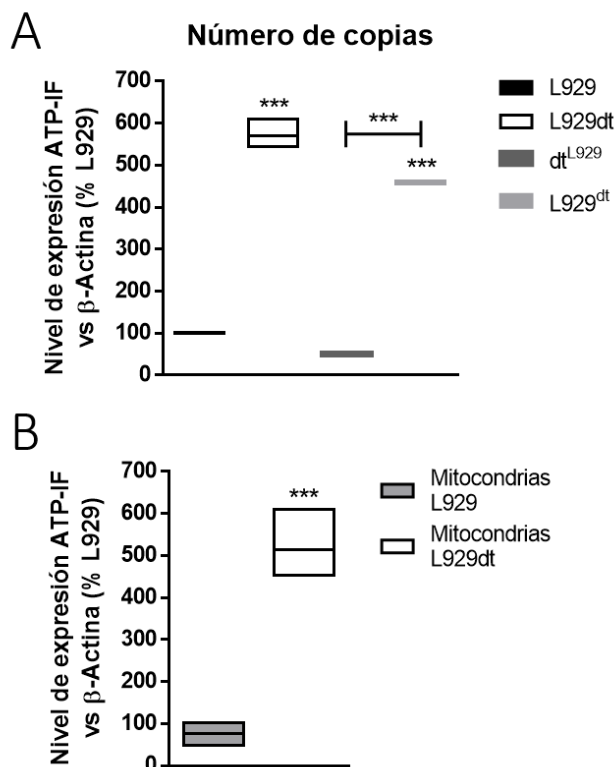


**Figura 4.55.** Número de copias del mtDNA en las células L929, L929dt, dt<sup>L929</sup> y L929dt. El cDNA de estas células fue obtenido a partir del aislamiento de su RNA y la expresión de estos genes fue analizada por RT-PCR. Las gráficas muestran el porcentaje del número de copias del mtDNA, normalizado con el gen SDHA, respecto al de las células L929. Los resultados son la media  $\pm$  SD de n=3. \*p<0.05.

Los resultados obtenidos muestran que tanto en las células L929dt como en las células L929<sup>dt</sup> hay un aumento significativo del número de copias del mtDNA respecto a las células parentales L929 (*Figura 4.55*). Esto no sucede en los híbridos dt<sup>L929</sup>, en los cuales la cantidad de copias del genoma mitocondrial es similar al de las células L929, concordando así el número de copias de mtDNA de cada línea celular con el origen de las mitocondrias que poseen (*Figura 4.55*).

#### 4.3.8.7 Número de copias de la ATP-IF

Por último, se ha descrito en la literatura que el factor inhibitorio 1 de la ATP-sintasa (ATP-IF) es capaz de actuar como una proteína reguladora importante en situaciones de estrés energético o en reprogramación metabólica en el cáncer (García-Bermúdez & Cuezva, 2016). Dado que las células L929dt poseen mitocondrias defectuosas y generan más ROS basales que las células parentales, se quiso evaluar si este factor también desempeñaba un papel relevante en el fenotipo de estas células. Para ello, se analizó la expresión de esta proteína por RT-PCR en las células L929, L929dt y en los híbridos dt<sup>L929</sup> y L929<sup>dt</sup>, tal como se indica en el *Apartado 3.4.7.2*.



**Figura 4.56.** Número de copias del gen que codifica la proteína ATP-IF en las células L929, L929dt,  $dt^{L929}$  y L929 $^{dt}$ . El cDNA de estas células fue obtenido a partir del aislamiento de su RNA y la expresión de estos genes fue analizada por RT-PCR. Las gráficas muestran el porcentaje del número de copias de cada enzima respecto a la de la  $\beta$ -actina. Los resultados son la media  $\pm$  SD de  $n=3$ . \*\*\* $p<0.001$ .

Los resultados se recogen en la *Figura 4.56*. Como se puede observar, el nivel de expresión de la ATP-IF se encuentra aumentado en las células L929dt y L929 $^{dt}$  respecto a las células parentales (*Figura 4.56A*). Esto se puede apreciar mejor en la *Figura 4.56B*, donde se evidencia que las células con mitocondrias L929dt (L929dt y L929 $^{dt}$ ) poseen niveles mucho mayores de este inhibidor en comparación con aquellas que poseen mitocondrias L929 (L929 y  $dt^{L929}$ ).

#### 4.3.9 Capacidad tumorigénica de los híbridos $dt^{L929}$ y $L929^{dt}$ *in vivo* por inyección intraesplénica

En experimentos anteriores, se pudo demostrar que las células  $L929^{dt}$  eran capaces de formar tumores de mayor tamaño en ratones atímicos en comparación con las células parentales, tanto por inyección subcutánea (*Figura 4.39*) como por inyección intraesplénica (*Figura 4.41*). Una vez generados los híbridos transmitocondriales de estas dos líneas celulares y tras demostrar que dichos híbridos conservan las mismas características *in vitro* que las células cuyas mitocondrias poseen, se propuso estudiar sus características tumorigénicas *in vivo*. Para ello, se emplearon 4 grupos de 3 ratones atímicos cada uno, a los que se les inyectó de forma intraesplénica  $0.25 \times 10^6$  células  $L929$ ,  $L929^{dt}$ ,  $dt^{L929}$  o  $L929^{dt}$ . Tras 21 días, se sacrificaron los ratones y se examinó la presencia de metástasis de forma macroscópica. Los tumores detectados en los bazo u otros órganos se extirparon y se midieron.

**Tabla 4.3.** Volumen de los tumores formados por las células  $L929$ ,  $L929^{dt}$ ,  $dt^{L929}$  y  $L929^{dt}$  en ratones atímicos. Se inyectaron  $2.5 \times 10^5$  células de cada tipo de forma intraesplénica en los ratones. A día 21, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los bazo, los tumores metastásicos y se midió el volumen de los tumores formados. La tabla muestra los tumores metastásicos detectados en cada ratón, y la media del volumen de los tumores formados en los bazo para cada línea celular.

	Detección de metástasis			
	$L929$	$L929^{dt}$	$dt^{L929}$	$L929^{dt}$
Ratón 1	---	Adyacente: 2 g	---	Adyacente: 3 g Estómago: 0.4
Ratón 2	---	---	---	---
Ratón 3	---	---	---	Adyacente: 1.5 g Canales seminales: 1.2 g
<b>Media (mm<sup>3</sup>)</b>	198	645	8.55	3105

De nuevo, se observó que los tumores derivados de células  $L929^{dt}$  eran mayores a los formados por las células  $L929$  (media de 645 vs 198 mm<sup>3</sup>), y también que los tumores derivados de los híbridos  $L929^{dt}$  mostraron un tamaño sustancialmente mayor que aquellos formados por los híbridos  $dt^{L929}$ , que de hecho fueron pequeños (media de 3105 vs 8.55 mm<sup>3</sup>) (*Tabla 4.3*). Si se compara el tamaño de los tumores derivados de las células que contienen mitocondrias  $L929$  ( $L929$  y  $dt^{L929}$ ) con el de los tumores derivados de células que poseen mitocondrias  $L929^{dt}$  ( $L929^{dt}$  y  $L929^{dt}$ ), la diferencia es estadísticamente significativa (media de 1875 vs 103 mm<sup>3</sup>). En cuanto a su capacidad metastásica, los tumores formados por células  $L929^{dt}$  y  $L929^{dt}$  formaron metástasis en 3 de los 6 ratones ensayados: un tumor adyacente en uno de los ratones  $L929^{dt}$ , 2 metástasis en el ratón 1 inyectado con células  $L929^{dt}$  (uno adyacente y otro en el estómago) y otras 2 en el ratón 3 de las células  $L929^{dt}$  (uno adyacente y otro en los canales seminales) (*Tabla*

4.3). Sin embargo, no se detectó metástasis en ninguno de los ratones en los que se inyectaron células con mitocondrias L929, ya fueran células L929 parentales o el híbrido dt<sup>L929</sup> (Tabla 4.3).

A



B



**Figura 4.57.** Morfoloía de los tumores formados por las células L929dt (Ratón 1). Se inyectaron  $2.5 \times 10^5$  células L929dt forma intraesplénica en un ratón atímico. A día 21, se sacrificó el ratón y se extrajo el bazo y el tumor adyacente. (A) Morfoloía del bazo. (B) Morfoloía del tumor adyacente.

En la *Figura 4.57* se muestra la morfoloía de los tumores formados en uno de los ratones con células de mitocondrias L929dt (Ratón 1 - L929dt). Se puede observar que las células L929dt formaron tumores en el bazo en varios puntos del mismo, y formando varios lóbulos (*Figura 4.57A*). El tumor adyacente que éstas formaron mostró una apariencia sólida y compacta, a diferencia de los tumores formados en el bazo, cuya forma era más gelatinosa (*Figura 4.57*).

#### 4.3.10 Generación de los híbridos $dt^{B16}$ , $B16^{dt}$ , $dt^{MC57G}$ y $MC57G^{dt}$

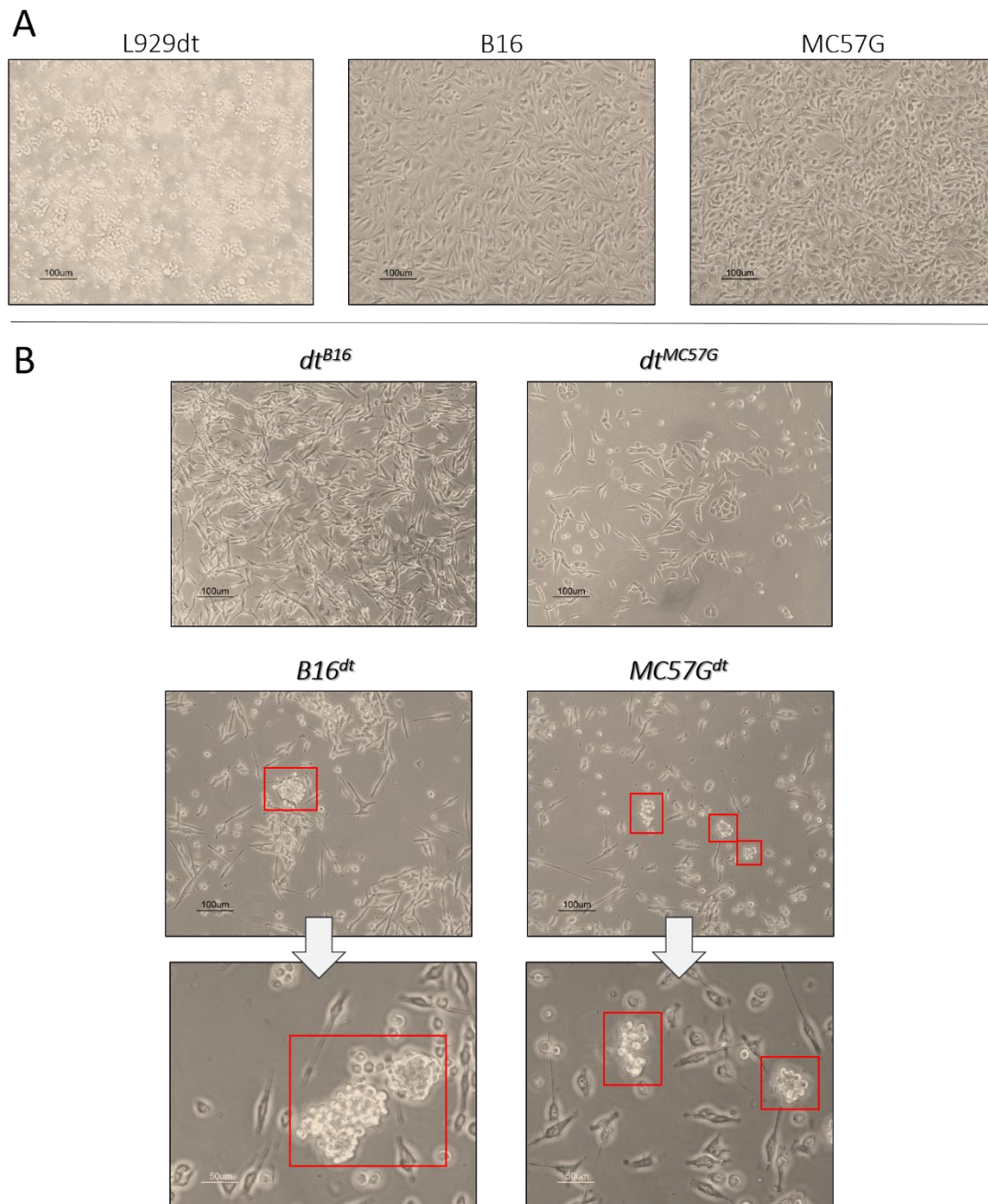
Además de la generación de los híbridos  $dt^{L929}$  y  $L929^{dt}$ , que sufrieron procesos de adherencia y desadherencia respectivamente, se quiso comprobar si estos fenómenos podían suceder también empleando otras líneas celulares distintas a las células L929. Para ello, se utilizaron las líneas celulares murinas de melanoma B16 y de fibrosarcoma MC57G.

En combinación con las células  $L929^{dt}$ , se crearon un total de 4 líneas transmitocondriales a partir de ellas:

- $dt^{B16}$ : Origen nuclear  $L929^{dt}$  y origen mitocondrial B16.
- $dt^{MC57G}$ : Origen nuclear  $L929^{dt}$  y origen mitocondrial MC57G.
- $B16^{dt}$ : Origen nuclear B16 y origen mitocondrial  $L929^{dt}$ .
- $MC57G^{dt}$ : Origen nuclear MC57G y origen mitocondrial  $L929^{dt}$ .

La forma en la que se generaron y seleccionaron los híbridos se recoge en el *Apartado* 3.3. Por una parte, para los híbridos de origen nuclear  $L929^{dt}$  ( $dt^{B16}$  y  $dt^{MC57G}$ ), se trataron las células  $L929^{dt}$  con R6G para eliminar sus mitocondrias, y se fusionaron con las células B16 o MC57G previamente enucleadas por tratamiento con citocalasina B y centrifugación. Por otra parte, para los híbridos de origen mitocondrial  $L929^{dt}$  ( $B16^{dt}$  y  $MC57G^{dt}$ ), se trataron las células B16 y MC57G con R6G para eliminar sus mitocondrias, y se fusionaron con las mitocondrias purificadas de las células  $L929^{dt}$ .

Para su selección, todas las células tratadas con R6G fueron incapaces de sobrevivir en medio DMEM complejo sin suplementar con uridina; y la eficiencia de la enucleación y de la purificación de las mitocondrias se comprobó por el no crecimiento de dichas células enucleadas o de las mitocondrias aisladas en los pocillos.

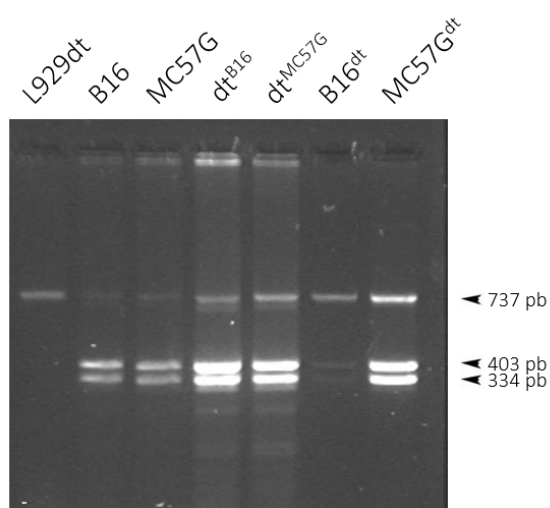


**Figura 4.58.** Apariencia de los híbridos formados a partir de las células L929dt, B16 y MC57G. Las imágenes muestran la apariencia al microscopio óptico de las (A) Células parentales L929dt, B16 y MC57G; y los híbridos (B)  $dt^{B16}$ ,  $dt^{MC57G}$ ,  $B16^{dt}$  y  $MC57G^{dt}$ . Los recuadros en rojo delimitan agrupaciones de células despegadas.

En la *Figura 4.58* se muestra la apariencia de los híbridos formados al microscopio. Se puede observar, por un lado, que los híbridos de origen nuclear L929dt ( $dt^{B16}$  y  $dt^{MC57G}$ ) al fusionarse con las células B16 y MC57G enucleadas, sufrieron un proceso de adherencia a la placa de cultivo, volviendo a aparentar una morfología fibroblástica (*Figura 4.58B*). Por otro lado, las células B16 y MC57G que se fusionaron con las mitocondrias de las células L929dt, comenzaron a experimentar un proceso parcial de desadherencia (*Figura 4.58B*). Para estos casos, a diferencia

de los cíbridos L929<sup>dt</sup>, no pareció completarse este proceso tras 30 días de incubación en cultivo, aparentando coexistir ambos tipos de morfologías en la placa de cultivo.

Para comprobar la inserción de las mitocondrias de interés en los cíbridos recién formados, se llevó a cabo una RFLP. En las células L929dt, la mutación C4859T en el mtDNA elimina un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HphI, mientras que en las mitocondrias de las células B16 y MC57G, al igual que en el caso de las células L929, se presenta la versión 4859C, que la enzima HphI reconoce y corta. Tal y como se detalla en el *Apartado 3.4.5*, se amplificó un fragmento de 737 pares de bases que contenía este sitio de reconocimiento, se digirió con la enzima HphI y los fragmentos obtenidos se separaron en un gel de agarosa.



**Figura 4.59.** Verificación de fusión mitocondrial de los cíbridos transmitocondriales de las células B16 y MC57G con las células L929dt por RFLP. El fragmento de mtDNA de interés se amplificó por PCR, se digirió con la enzima de restricción HphI y los productos obtenidos separaron en un gel de agarosa al 2% (p/v).

Como se observa en la *Figura 4.59*, la enzima HphI no corta en el mtDNA amplificado de las células L929dt (banda en 737 pares de bases), mientras que en las células B16 y MC57G sí lo hace, generándose dos bandas de 403 y 334 pares de bases. Respecto a los cíbridos, todos los casos se aprecia la presencia tanto de la banda de 737 como de los fragmentos de 403 y 334 pares de bases (*Figura 4.59*), indicativo de la presencia de ambos tipos de mitocondrias en los cíbridos en heteroplasmia.



#### 4.3.11 Discusión

Otto Warburg hipotetizó en sus trabajos, por primera vez, que el elevado **metabolismo glucolítico** de las células tumorales se debía a la presencia de mitocondrias defectuosas (Warburg, 1956b). A pesar de ello, numerosos estudios han demostrado que también pueden encontrarse mitocondrias perfectamente funcionales en los tumores (Vyas, Zaganjor, & Haigis, 2016). De hecho, no se conoce hasta la fecha que las mutaciones en el genoma mitocondrial induzcan tumorigénesis por sí mismas en células no transformadas. No obstante, el aumento de la tasa glucolítica y la reducción del uso de la vía OXPHOS son comportamientos característicos de las células cancerosas (Hanahan & Weinberg, 2011). Parece que estos cambios en su metabolismo les confiere, más bien, ventajas proliferativas durante las diversas etapas de progresión tumoral (Wallace, 2012). Así pues, aunque las mutaciones en el mtDNA no siempre pueden encontrarse en los tumores, es probable que durante la progresión tumoral acaben acumulándose diversas alteraciones en la maquinaria OXPHOS, dado que ello promueve aún más el metabolismo glucolítico.

En los últimos años, se ha demostrado que los complejos respiratorios mitocondriales no se encuentran en solitario en la IMM, sino que tienden a asociarse en forma de **SC's** de una forma dinámica, en función del estado energético de las células y de la disponibilidad de nutrientes (Acín-Pérez et al., 2008; Lapuente-Brun et al., 2013). De hecho, la capacidad de la mitocondria de reorganizar los SC's durante la mETC se ha descrito como un mecanismo de la misma para optimizar la eficiencia energética (Lapuente-Brun et al., 2013) y disminuir la producción de ROS. En esta parte del trabajo, se ha estudiado en detalle las diferencias metabólicas y mitocondriales entre la línea celular L929dt, que perdió espontáneamente la capacidad de adhesión a la placa de cultivo, y sus células parentales L929. En un estudio anterior de nuestro grupo, se encontraron defectos en la formación de los SC's que contienen el C.I, que se asocian además con una mayor actividad del C.II (Marco, 2015) (ver *Figura 2.1*). Sorprendentemente, se ha descrito una reorganización similar de los SC's durante la activación de los macrófagos (Garaude et al., 2006), mostrando que estos aparentes defectos en la respiración celular pueden aportar ventajas en según qué células bajo condiciones específicas.

La **secuenciación del mtDNA** de las células L929dt, en comparación con sus células parentales, dio como resultado la aparición de dos mutaciones de cambio de base en la subunidad ND2 del C.I, concretamente las mutaciones C4859T y C4206T (*Figura 4.37*). En estudios anteriores se había demostrado un mayor potencial tumorigénico y metastásico en un modelo murino de cáncer de pulmón, asociado a mutaciones en la subunidad ND6 del C.I (Ishikawa et al., 2008). En

ese estudio. Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia en este gen entre las células L929 y L929dt. En ese estudio, se asociaba esa mayor capacidad metastásica a una mayor capacidad de generación de ROS (Ishikawa et al., 2008). Sin embargo, en el modelo empleado en esta Tesis se ha encontrado más bien lo contrario, debido a una sobreexpresión de enzimas antioxidantes en las células mutadas, como se comentará más adelante. En definitiva, el mecanismo de promoción de la metástasis observado en nuestro estudio es esencialmente diferente al descrito por el grupo de Hayashi (Ishikawa et al., 2008).

La mayoría de los estudios en los que se han detectado mutaciones en el mtDNA de los tumores se han realizado en tumores humanos; por tanto, las mutaciones detectadas en los tumores murinos del presente trabajo no pueden ser exactamente las mismas. Se han reportado varias mutaciones en la subunidad ND2 del C.I en tumores humanos: en cáncer de mama (Grzybowska-Szatowska & Slaska, 2014; L. H. Li et al., 2014; D. J. Tan, Bai, & Wong, 2002), páncreas (Lam et al., 2012), oral (Prior et al., 2006) y carcinoma de cabeza y cuello (W. Sun et al., 2009; Zhou et al., 2007). Especialmente interesante es el trabajo de Sun et al. (W. Sun et al., 2009), donde se describe que la transfección en líneas celulares de mitocondrias con la mutación G4776A en ND2 inducía la pérdida de la adherencia a la placa de cultivo, un aumento en la producción de ROS, así como en la expresión de HIF-1, en la actividad de la enzima PDK2 y en los niveles de piruvato celulares. Muchas otras mutaciones puntuales se han encontrado en el mtDNA de numerosos tipos de cáncer, además de defectos en otros componentes o enzimas que participan en la funcionalidad OXPHOS (Hsu et al., 2016). Además, como se ha comentado en la Introducción, cada vez existen más datos apuntando a una correlación entre los defectos en la vía OXPHOS o en el mtDNA con la progresión tumoral y la metástasis (ver *Tabla 1.1*), lo cual va en consonancia con los resultados obtenidos en las células L929dt.

Las mitocondrias, a pesar de tener su propio genoma, están formadas tanto por componentes que se sintetizan a partir de su DNA como por numerosos factores provenientes del núcleo. Además de esto, aunque Sun et al. (W. Sun et al., 2009) ya reportaron un proceso de desadherencia de la placa de cultivo por causa de una mutación puntual en la subunidad ND2 del C.I, no hay datos hasta la fecha que vinculen causalmente las mutaciones en el mtDNA encontradas en este trabajo con dicho proceso de desadherencia. Por todo ello, las mutaciones encontradas en ND2 en las células L929dt no permiten descartar del todo alguna contribución nuclear en el fenotipo que despliegan estas células. Así pues, se decidió intercambiar las mitocondrias de las células parentales y las mitocondrias L929dt entre sí, generando dos sublíneas derivadas de *cíbridos transmitocondriales*, denominados *dt<sup>L929</sup>* (núcleo L929dt,

mitocondrias L929) y  $L929^{dt}$  (núcleo L929, mitocondrias L929dt). Como resultado del proceso, las células  $L929^{dt}$ , al recibir las mitocondrias de las células L929dt, experimentaron un proceso de desadherencia, mientras que a las células  $dt^{L929}$ , cuando adquirieron las mitocondrias de las células L929, les sucedió al contrario, readquiriendo la capacidad de adhesión a la placa de cultivo (*Figura 4.47*). Estas variaciones morfológicas permiten no sólo correlacionar, sino establecer una clara causalidad entre las mutaciones C4859T y C4206T en la subunidad ND2 del C.I con el proceso de desadherencia de la placa de cultivo de estas células tumorales.

Dado que los cíbridos recién mencionados poseen un contexto nuclear similar, se quiso también comprobar si este proceso de desadherencia podía suceder también bajo otros contextos nucleares. Para ello, se escogieron las líneas celulares murinas **B16** (melanoma) y **MC57G** (fibrosarcoma). Se formaron **4 líneas cíbridas** a partir de las combinaciones posibles con las células L929dt. Los dos cíbridos de origen nuclear L929dt, al introducir las mitocondrias de las células B16 o MC57G ( $dt^{B16}$  y  $dt^{MC57G}$ , respectivamente) recuperaron la capacidad de adhesión a la placa de cultivo, volviendo a cambiar su morfología a fibroblástica (*Figura 4.58*). Respecto a los cíbridos inversos ( $B16^{dt}$  y  $MC57^{dt}$ ), no se completó por completo el proceso de desadherencia que sí se observó en las células  $L929^{dt}$ , apreciándose en el mismo cultivo una población adherente y otra no adherente (*Figura 4.58*). El análisis por RFLP confirmó la presencia de ambos tipos de mitocondrias en heteroplasmia en los 4 cíbridos formados (*Figura 4.59*), explicando de esta forma el fenotipo dual observado en los cíbridos  $B16^{dt}$  y  $MC57^{dt}$ . Estos datos sugieren, en cualquier caso, que el fenotipo de desadherencia previo al proceso metastásico puede estar íntimamente relacionado con mutaciones en el mtDNA.

El análisis de la formación de SC's de los cíbridos derivados de las células L929 y L929dt mostró que el patrón de bandas de los SC's de las mismas dependían de las mitocondrias que poseían, obteniendo patrones similares en las células  $L929^{dt}$  respecto a las células L929dt, y en las células  $dt^{L929}$  respecto a las L929 (*Figura 4.52*). Es decir, se asocia claramente la menor capacidad de asociación del C.I con el resto de SC's en las células con mitocondrias L929dt con respecto a las células con mitocondrias que no expresan esas mutaciones. Por tanto, esto supone la pérdida de eficiencia de la mETC para las células  $L929^{dt}$  y la ganancia de la misma en el caso de las células  $dt^{L929}$ . En concordancia con esto, la **medición de ROS** basales en estos cíbridos y en sus células parentales dio como resultado una mayor producción de ROS generales para las líneas celulares con mitocondrias L929dt, respecto a las que poseen mitocondrias L929 (*Figura 4.54*). Este aumento en los niveles de ROS correlacionó con un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD2 y catalasa en las células L929dt (*Figura 4.35*). En relación con esto, se ha descrito que el estrés celular causado por la pérdida de adhesión de la matriz extracelular provoca

un gran aumento en los ROS generados en las células tumorales, previniendo de esta manera la formación de metástasis (Piskounova et al., 2015). Sin embargo, aquellas células que consiguen formar metástasis desarrollan mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo que generan (Jiang et al., 2016; Schafer et al., 2009), como por ejemplo el aumento en la expresión de enzimas de la ruta metabólica del folato que generan NADPH (Piskounova et al., 2015). El aumento de la actividad tanto de SOD2 como de la catalasa pueden suponer adaptaciones adicionales al estrés oxidativo de células tumorales que han desarrollado una alta capacidad metastásica, y los datos obtenidos en este trabajo estarían de acuerdo con ese modelo de generación de metástasis.

Otra característica encontrada en las células con mitocondrias L929dt es que poseen un mayor **número de copias del mtDNA** en comparación con las células con mitocondrias parentales (Figura 4.55). Otros estudios han encontrado variaciones en el número de copias del genoma mitocondrial en distintos tipos de cáncer humano, con algunos reportando una disminución en el número de copias y otros, sin embargo, con un aumento (Hsu et al., 2016). Los factores que involucran estos cambios no se conocen por completo, si bien, a juzgar por los resultados en la literatura, parece que el aumento o la disminución del número de copias es dependiente del tipo de tumor. En el caso de las células L929dt y L929<sup>dt</sup>, este aumento podría venir motivado como un mecanismo de compensación, para tratar de igualar el rendimiento OXPHOS de las células parentales.

Recientemente, se ha descrito que la proteína **ATP-IF**, un inhibidor del C.V, se encuentra sobreexpresado en varios tipos de cáncer y se considera un marcador de peor pronóstico en los pacientes (García-Bermúdez & Cuezva, 2016). El análisis de su expresión en las células L929 y derivadas reveló que tanto las células L929dt como las L929<sup>dt</sup>, ambas con mitocondrias defectuosas, poseían niveles de este inhibidor mucho más altas que las células parentales (Figura 4.56). Esto sugiere, por una parte, que el aumento en el número de copias de esta proteína puede participar, al igual que los defectos en el C.I, en la menor capacidad de las mitocondrias L929dt de realizar OXPHOS; por otra, esta observación se asocia también con la mayor capacidad tumorigénica de las células L929dt (Figura 4.39 y Figura 4.41).

Las células L929dt poseen mutaciones en su mtDNA que les limita la función OXPHOS a través del C.I, pero no les impide que esta vía funcione a través del C.II, cuya actividad se encuentra en efecto aumentada en estas células (Marco, 2015) (ver Figura 2.1B). De hecho, ya se ha observado que la pérdida completa de la función OXPHOS elimina la tumorigenicidad de las células cancerosas (Cruz-Bermúdez et al., 2015; Stockwin et al., 2010). Así pues, parece que la pérdida parcial, pero no total, de la función OXPHOS en la mitocondria puede promover el

desarrollo tumoral. En consonancia con esto, otros datos en la literatura apoyan la importancia de la **presencia de mitocondrias alteradas en las células tumorales**. En primer lugar, las mitocondrias son las principales responsables de la muerte celular programada o apoptosis, a través de la permeabilización de la OMM (Zamzami et al., 1996). La mayoría de mitocondrias en las células tumorales acumulan mutaciones para este mecanismo, contribuyendo en parte a la resistencia a la apoptosis y promoviendo así su propia supervivencia. En segundo lugar, las mitocondrias son capaces de adaptar su metabolismo energético en función de la disponibilidad de nutrientes en el entorno (Lapiente-Brun et al., 2013), empleando distintas rutas anapleróticas para optimizar los recursos que les rodean durante todas las etapas de progresión tumoral (P. E. Porporato, Filigheddu, Pedro, Kroemer, & Galluzzi, 2018). Por último, un mayor fenotipo Warburg, es decir, un menor uso de la vía OXPHOS para obtener ATP, conlleva un aumento en la producción de lactato para regenerar el NAD<sup>+</sup> intracelular. La secreción de lactato al TME también confiere ventajas a las células tumorales, como por ejemplo, una menor capacidad citotóxica de las células del SI (Fischer et al., 2007), siendo de hecho un marcador de peor pronóstico en pacientes con cáncer (Molon, Cali, & Viola, 2016).

Con el objetivo de caracterizar en mayor detalle los cambios metabólicos inducidos en las células L929dt, se analizó el **quinoma** de estas células y se comparó con el de las células parentales. Los resultados mostraron un aumento muy significativo de la actividad de las PTK y una bajada en la actividad de las STK de las células L929dt (*Figura 4.45*). Estos cambios drásticos de las actividades de las quinasas en estas células afectan a numerosas vías de señalización, de entre las cuales se encuentran las rutas dependientes de los receptores de EGF y FGF (*Figura 4.46A*). En concreto, dentro de estas vías cabe destacar una elevada fosforilación y activación de FAK1, de la Fgr quinasa y de la subunidad reguladora p85 de la PI3K (*Figura 4.46B*). Curiosamente, se ha descrito que la activación de la quinasa Fgr correlaciona con un aumento de actividad del C.II de la mETC como mecanismo de adaptación metabólica (Acín-Pérez et al., 2014). Por otra parte, aumentos en la fosforilación en tirosina de estas quinasas se han correlacionado en algunos casos con un fenotipo tumoral agresivo, tales como: la tirosín quinasa de FGFR (J. Liu et al., 2018), FAK1 (Mierke et al., 2017; J. Zhang et al., 2015) y p85-PI3K (de la Cruz-Herrera et al., 2016; Martínez-Lorenzo et al., 2000). Estos datos obtenidos permitirán en un futuro utilizar inhibidores de esas quinasas, que parecen poder estar relacionadas con la tumorigénesis y especialmente con la metástasis, como tratamiento anti-metastásico con una mayor especificidad que los utilizados hasta el momento.

En este trabajo, se ha demostrado que las células L929dt poseen un mayor potencial tumorigénico **in vivo**, tanto por inyección subcutánea (*Figura 4.39*) como por inyección

intraesplénica (*Figura 4.41*). Esto vino asociado también a una capacidad de generar varias masas tumorales en el sitio de inyección e incluso varias estructuras y tipos de tejido tumoral, a juzgar por los datos obtenidos en las histologías (*Figura 4.40*). Además de esto, también se ha conseguido demostrar que los tumores formados por células que contienen las mitocondrias provenientes de las células L929dt son capaces de generar metástasis, mientras que aquellos formados por mitocondrias L929 no lo hacen (*Tabla 4.3*), confirmando así una mayor capacidad metastásica de estas células. A pesar de este mayor fenotipo agresivo, las células L929dt y L929<sup>dt</sup> son mucho más sensibles que las células parentales a la acción del inhibidor de la PDK1 DCA (*Figura 4.49*), que fuerza la utilización de la vía OXPHOS. Esta observación permite plantear al DCA como tratamiento eficaz de la metástasis, ya sea en solitario o en combinación con inmunoterapia, dado su efecto adicional en la expresión del MHC-I (Catalán et al., 2015).

# CONCLUSIONES

---





Los resultados obtenidos en este trabajo permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Los protocolos de expansión utilizados permiten la correcta expansión y activación simultánea de CTL y células NK provenientes tanto de PBMC como de UCB-MC.
2. La droga metabólica dicloroacetato (DCA) susceptibiliza a la acción de eCTL y eNK a la línea celular de mieloma múltiple MM.1S, que expresa p53 *wild type*, pero no a las líneas celulares de B-CLL Mec-1 WT y Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, que contienen p53 mutado.
3. La susceptibilización con este fármaco depende del aumento en la expresión de ICAM-1 en los tumores, así como de DR5 y de la acción de TRAIL en el caso de las células eNK.
4. La metformina induce la susceptibilización de las células Mec-1 WT y Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub> a la muerte celular inducida por eCTL y eNK de UCB-MC y PBMC, pero este efecto no se observa en las células MM.1S.
5. Los mecanismos de susceptibilización de la metformina son en este caso dependientes tanto de la célula diana como de la célula efectora, viéndose implicados LFA-1-ICAM-1, TRAIL y sus receptores y el sistema PD-1-PD-L1.
6. El DCA es capaz de sensibilizar a las líneas celulares Mec-1 WT, Mec-1 Bcl-x<sub>L</sub>, Mec-1 Mcl-1 y U266, así como a células de pacientes de B-CLL a la muerte inducida por el fármaco ibrutinib.
7. Las células L929dt poseen mutaciones en la subunidad ND2 del C.I.
8. Las células L929dt poseen una mayor resistencia al estrés oxidativo que sus células parentales, debido a una mayor actividad de las enzimas SOD y catalasa.
9. Las células L929dt sufren además una remodelación significativa de multitud de vías de señalización, que pueden ser dianas terapéuticas.
10. Las células L929dt poseen una mayor capacidad tumorigénica y metastásica *in vivo*.
11. Los híbridos transmitocondriales formados a partir de las células L929 y L929dt presentan fenotipos similares a las células parentales de las que provienen sus mitocondrias, demostrando que las mutaciones observadas en el mtDNA de las células con mitocondrias L929dt son las principales responsables del fenotipo tumoral agresivo que presentan.
12. A pesar de este fenotipo tumoral agresivo, el fármaco DCA, que fuerza el uso de la vía OXPHOS, es capaz de revertir este metabolismo glucolítico e inducir muerte celular en células con mitocondrias L929dt.



# BIBLIOGRAFÍA

---



- Abdelmalak, M., Lew, A., Ramezani, R., Shroads, A. L., Coats, B. S., Langaee, T., . . . Stacpoole, P. W. (2013). Long-term safety of dichloroacetate in congenital lactic acidosis. *Mol Genet Metab*, 109(2), 139-143. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.03.019
- Acín-Pérez, R., Carrascoso, I., Baixauli, F., Roche-Molina, M., Latorre-Pellicer, A., Fernández-Silva, P., . . . Enríquez, J. A. (2014). ROS-triggered phosphorylation of complex II by Fgr kinase regulates cellular adaptation to fuel use. *Cell Metab*, 19(6), 1020-1033. doi: 10.1016/j.cmet.2014.04.015
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enríquez, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*, 32(4), 529-539. doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.021
- Advani, R. H., Buggy, J. J., Sharman, J. P., Smith, S. M., Boyd, T. E., Grant, B., . . . Fowler, N. H. (2013). Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol*, 31(1), 88-94. doi: 10.1200/jco.2012.42.7906
- Agnoletto, C., Brunelli, L., Melloni, E., Pastorelli, R., Casciano, F., Rimondi, E., . . . Zauli, G. (2015). The anti-leukemic activity of sodium dichloroacetate in p53mutated/null cells is mediated by a p53-independent ILF3/p21 pathway. *Oncotarget*, 6(4), 2385-2396.
- Agnoletto, C., Melloni, E., Casciano, F., Rigolin, G. M., Rimondi, E., Celeghini, C., . . . Zauli, G. (2014). Sodium dichloroacetate exhibits anti-leukemic activity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and synergizes with the p53 activator Nutlin-3. *Oncotarget*, 5(12), 4347-4360.
- Ajdukovic, J. (2016). HIF-1--a big chapter in the cancer tale. *Exp Oncol*, 38(1), 9-12.
- Al-Wasaby, S., Miguel, D., Aporta, A., Naval, J., Conde, B., Martinez-Lostao, L., & Anel, A. (2015). In vivo potential of recombinant granulysin against human tumors. *Oncoimmunology*, 4:9, e1036213, DOI: 1036210.1031080/2162402X.1032015.1036213.
- Almuhaideb, A., Papathanasiou, N., & Bomanji, J. (2011). 18F-FDG PET/CT imaging in oncology. *Ann Saudi Med*, 31(1), 3-13. doi: 10.4103/0256-4947.75771
- Allende-Vega, N., Krzywinska, E., Orecchioni, S., Lopez-Royuela, N., Reggiani, F., Talarico, G., . . . Villalba, M. (2015). The presence of wild type p53 in hematological cancers improves the efficacy of combinational therapy targeting metabolism. *Oncotarget*, 6(22), 19228-19245.

- Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., . . . Boyd, M. R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*, 48(3), 589-601.
- Amuthan, G., Biswas, G., Ananadatheerthavarada, H. K., Vijayasathy, C., Shephard, H. M., & Avadhani, N. G. (2002). Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene*, 21(51), 7839-7849. doi: 10.1038/sj.onc.1205983
- Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A. M., & Golstein, P. (1994). T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur J Immunol*, 24(10), 2469-2476. doi: 10.1002/eji.1830241032
- Antón, A., Anel, A., Martínez-Lostao, L., Pardo, J., & Pazo, R. (2018). Inmunología Tumoral e Inmunoterapia del Cáncer. 1ª Ed. *Amazing Books*.
- Arnold, R. S., Fedewa, S. A., Goodman, M., Osunkoya, A. O., Kissick, H. T., Morrissey, C., . . . Petros, J. A. (2015). Bone metastasis in prostate cancer: Recurring mitochondrial DNA mutation reveals selective pressure exerted by the bone microenvironment. *Bone*, 78, 81-86. doi: 10.1016/j.bone.2015.04.046
- Ashjian, E., & Redic, K. (2015). Multiple myeloma: Updates for pharmacists in the treatment of relapsed and refractory disease. *J Oncol Pharm Pract*. doi: 10.1177/1078155215572036
- Attwell, S., Roskelley, C., & Dedhar, S. (2000). The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene*, 19(33), 3811-3815. doi: 10.1038/sj.onc.1203711
- Axelrod, J. D. (2006). Cell shape in proliferating epithelia: a multifaceted problem. *Cell*, 126(4), 643-645. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.018
- Barber, D. F., Faure, M., & Long, E. O. (2004). LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol*, 173(6), 3653-3659.
- Batandier, C., Guigas, B., Demaille, D., El-Mir, M. Y., Fontaine, E., Rigoulet, M., & Leverve, X. M. (2006). The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr*, 38(1), 33-42. doi: 10.1007/s10863-006-9003-8
- Bendas, G., & Borsig, L. (2012). Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol*, 2012, 676731. doi: 10.1155/2012/676731

- Bielenberg, D. R., & Zetter, B. R. (2015). The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J*, 21(4), 267-273. doi: 10.1097/ppo.0000000000000138
- Blackburn, R. V., Galoforo, S. S., Berns, C. M., Armour, E. P., McEachern, D., Corry, P. M., & Lee, Y. J. (1997). Comparison of tumor growth between hsp25- and hsp27-transfected murine L929 cells in nude mice. *Int J Cancer*, 72(5), 871-877.
- Bond, D. A., & Woyach, J. A. (2019). Targeting BTK in CLL: Beyond Ibrutinib. *Curr Hematol Malig Rep*. doi: 10.1007/s11899-019-00512-0
- Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., . . . Michelakis, E. D. (2007). A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*, 11(1), 37-51. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.020
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brand, K. A., & Hermfisse, U. (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *Faseb j*, 11(5), 388-395.
- Brandon, M., Baldi, P., & Wallace, D. C. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 25(34), 4647-4662. doi: 10.1038/sj.onc.1209607
- Brandsma, D., Dorlo, T. P., Haanen, J. H., Beijnen, J. H., & Boogerd, W. (2010). Severe encephalopathy and polyneuropathy induced by dichloroacetate. *J Neurol*, 257(12), 2099-2100. doi: 10.1007/s00415-010-5654-9
- Bremnes, R. M., Donnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., . . . Busund, L. T. (2011). The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 6(1), 209-217. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd
- Burger, J. A., & Chiorazzi, N. (2013). B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol*, 34(12), 592-601. doi: 10.1016/j.it.2013.07.002
- Caino, M. C., Chae, Y. C., Vaira, V., Ferrero, S., Nosotti, M., Martin, N. M., . . . Altieri, D. C. (2013). Metabolic stress regulates cytoskeletal dynamics and metastasis of cancer cells. *J Clin Invest*, 123(7), 2907-2920. doi: 10.1172/jci67841
- Calcinotto, A., Filipazzi, P., Grioni, M., Iero, M., De Mito, A., Ricupito, A., . . . Rivoltini, L. (2012). Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and

- murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res*, 72(11), 2746-2756. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-1272
- Calon, A., Lonardo, E., Berenguer-Llergo, A., Espinet, E., Hernando-Mombona, X., Iglesias, M., . . . Batlle, E. (2015). Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet*, 47(4), 320-329. doi: 10.1038/ng.3225
- Caneba, C. A., Bellance, N., Yang, L., Pabst, L., & Negrath, D. (2012). Pyruvate uptake is increased in highly invasive ovarian cancer cells under anoikis conditions for anaplerosis, mitochondrial function, and migration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 303(8), E1036-1052. doi: 10.1152/ajpendo.00151.2012
- Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., & Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell*, 64(2), 281-302.
- Cantrell, D. (2015). Signaling in lymphocyte activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(6). doi: 10.1101/cshperspect.a018788
- Carvalho, M. A., Zecchin, K. G., Seguin, F., Bastos, D. C., Agostini, M., Rangel, A. L., . . . Graner, E. (2008). Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer*, 123(11), 2557-2565. doi: 10.1002/ijc.23835
- Catalán, E., Charni, S., Jaime, P., Aguiló, J. I., Enríquez, J. A., Naval, J., . . . Anel, A. (2015). MHC-I modulation due to changes in tumor cell metabolism regulates tumor sensitivity to CTL and NK cells. *OncolImmunology*, 4(1), e985924. doi: 10.4161/2162402X.2014.985924
- Cavalier-Smith, T. (1987). Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*, 326(6111), 332-333. doi: 10.1038/326332a0
- Clark, E. S., Whigham, A. S., Yarbrough, W. G., & Weaver, A. M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res*, 67(9), 4227-4235. doi: 10.1158/0008-5472.can-06-3928
- Connolly, J. L., Schnitt, S. J., Wang, H. H., Longtine, J. A., Dvorak, A., & Dvorak, H. F. (2003). Tumor Structure and Tumor Stroma Generation. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. . *Holland-Frei Cancer Medicine*, . 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13447/>.



- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J*, 23(3), 536-545.
- Craven, L., Alston, C. L., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2017). Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 18, 257-275. doi: 10.1146/annurev-genom-091416-035426
- Cruz-Bermúdez, A., Vallejo, C. G., Vicente-Blanco, R. J., Gallardo, M. E., Fernandez-Moreno, M. A., Quintanilla, M., & Garesse, R. (2015). Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations. *Oncotarget*, 6(15), 13628-13643. doi: 10.18632/oncotarget.3698
- Cha, J. H., Yang, W. H., Xia, W., Wei, Y., Chan, L. C., Lim, S. O., . . . Hung, M. C. (2018). Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol Cell*, 71(4), 606-620.e607. doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.030
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559-1564. doi: 10.1126/science.1203543
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 563-572. doi: 10.1038/nrc865
- Chance, B., Estabrook, R. W., & Lee, C. P. (1963). Electron Transport in the Oxysome. *Science*, 140(3565), 379-380. doi: 10.1126/science.140.3565.379-c
- Chance, B., & Hess, B. (1959). Spectroscopic evidence of metabolic control. *Science*, 129(3350), 700-708.
- Chang, C. J., Yin, P. H., Yang, D. M., Wang, C. H., Hung, W. Y., Chi, C. W., . . . Lee, H. C. (2009). Mitochondrial dysfunction-induced amphiregulin upregulation mediates chemo-resistance and cell migration in HepG2 cells. *Cell Mol Life Sci*, 66(10), 1755-1765. doi: 10.1007/s00018-009-8767-5
- Chao, Y., Wu, Q., Acquafondata, M., Dhir, R., & Wells, A. (2012). Partial mesenchymal to epithelial reverting transition in breast and prostate cancer metastases. *Cancer Microenviron*, 5(1), 19-28. doi: 10.1007/s12307-011-0085-4
- Charni, S., de Bettignies, G., Rathore, M. G., Aguilo, J. I., van den Elsen, P. J., Haouzi, D., . . . Villalba, M. (2010). Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway. *J Immunol*, 185(6), 3498-3503. doi: 10.4049/jimmunol.1001250

- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1-10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
- Chester, C., Fritsch, K., & Kohrt, H. E. (2015). Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 6, 601. doi: 10.3389/fimmu.2015.00601
- Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2010). The role of p53 in glucose metabolism. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), 186-191. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.006
- Chockley, P. J., Chen, J., Chen, G., Beer, D. G., Standiford, T. J., & Keshamouni, V. G. (2018). Epithelial-mesenchymal transition leads to NK cell-mediated metastasis-specific immunosurveillance in lung cancer. *J Clin Invest*, 128(4), 1384-1396. doi: 10.1172/jci97611
- Chocron, E. S., Munkacsy, E., & Pickering, A. M. (2019). Cause or casualty: The role of mitochondrial DNA in aging and age-associated disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865(2), 285-297. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.09.035
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., . . . Cantley, L. C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184), 230-233. doi: 10.1038/nature06734
- Chu, Q. S., Sangha, R., Spratlin, J., L, J. V., Mackey, J. R., McEwan, A. J., . . . Michelakis, E. D. (2015). A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. doi: 10.1007/s10637-015-0221-y
- Dang, L., Yen, K., & Attar, E. C. (2016). IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann Oncol*, 27(4), 599-608. doi: 10.1093/annonc/mdw013
- Darmon, A. J., Nicholson, D. W., & Bleackley, R. C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*, 377(6548), 446-448. doi: 10.1038/377446a0
- Dasgupta, S., Soudry, E., Mukhopadhyay, N., Shao, C., Yee, J., Lam, S., . . . Sidransky, D. (2012). Mitochondrial DNA mutations in respiratory complex-I in never-smoker lung cancer patients contribute to lung cancer progression and associated with EGFR gene mutation. *J Cell Physiol*, 227(6), 2451-2460. doi: 10.1002/jcp.22980

- Davison, J. E., & Rahman, S. (2017). Recognition, investigation and management of mitochondrial disease. *Arch Dis Child*, 102(11), 1082-1090. doi: 10.1136/archdischild-2016-311370
- de Groot, A. E., Roy, S., Brown, J. S., Pienta, K. J., & Amend, S. R. (2017). Revisiting Seed and Soil: Examining the Primary Tumor and Cancer Cell Foraging in Metastasis. *Mol Cancer Res*, 15(4), 361-370. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-16-0436
- de la Cruz-Herrera, C. F., Baz-Martinez, M., Lang, V., El Motiam, A., Barbazan, J., Couceiro, R., . . . Rivas, C. (2016). Conjugation of SUMO to p85 leads to a novel mechanism of PI3K regulation. *Oncogene*, 35(22), 2873-2880. doi: 10.1038/onc.2015.356
- de Visser, J. A., & Rozen, D. E. (2006). Clonal interference and the periodic selection of new beneficial mutations in *Escherichia coli*. *Genetics*, 172(4), 2093-2100. doi: 10.1534/genetics.105.052373
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*, 2(5), e1600200. doi: 10.1126/sciadv.1600200
- Delaney, L. M., Ho, N., Morrison, J., Farias, N. R., Mosser, D. D., & Coomber, B. L. (2015). Dichloroacetate affects proliferation but not survival of human colorectal cancer cells. *Apoptosis*, 20(1), 63-74. doi: 10.1007/s10495-014-1046-4
- DeNicola, G. M., Karreth, F. A., Humpton, T. J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., . . . Tuveson, D. A. (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*, 475(7354), 106-109. doi: 10.1038/nature10189
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 25(1), 9-34. doi: 10.1007/s10555-006-7886-9
- DeVita, V. T., Jr., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 68(21), 8643-8653. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-6611
- Dhup, S., Dadhich, R. K., Porporato, P. E., & Sonveaux, P. (2012). Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des*, 18(10), 1319-1330.
- Diaz-Lopez, A., Moreno-Bueno, G., & Cano, A. (2014). Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res*, 6, 205-216. doi: 10.2147/cmar.s38156

- Díaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., & Devin, A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta*, 1807(6), 568-576. doi: 10.1016/j.bbabbio.2010.08.010
- Doherty, J. R., & Cleveland, J. L. (2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest*, 123(9), 3685-3692. doi: 10.1172/jci69741
- Dong, G., Mao, Q., Xia, W., Xu, Y., Wang, J., Xu, L., & Jiang, F. (2016). PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncol Lett*, 11(3), 1980-1986. doi: 10.3892/ol.2016.4168
- Duan, W., Shen, X., Lei, J., Xu, Q., Yu, Y., Li, R., . . . Ma, Q. (2014). Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression. *Biomed Res Int*, 2014, 461917. doi: 10.1155/2014/461917
- Duan, Y., Zhao, X., Ren, W., Wang, X., Yu, K. F., Li, D., . . . Zhang, Q. (2013). Antitumor activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: in vitro and in vivo evaluation. *Onco Targets Ther*, 6, 189-198. doi: 10.2147/ott.s40992
- Dunbar, E. M., Coats, B. S., Shroads, A. L., Langaee, T., Lew, A., Forder, J. R., . . . Stacpoole, P. W. (2014). Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. *Invest New Drugs*, 32(3), 452-464. doi: 10.1007/s10637-013-0047-4
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11), 991-998. doi: 10.1038/ni1102-991
- Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., . . . Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39(2), 171-183. doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.022
- Eagle, H. (1955). The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. *J Exp Med*, 102(5), 595-600.
- Egler, R. A., Ahuja, S. P., & Matloub, Y. (2016). L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pharmacol Pharmacother*, 7(2), 62-71. doi: 10.4103/0976-500x.184769
- El-Mir, M. Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Averet, N., Rigoulet, M., & Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*, 275(1), 223-228.

- Ellis, L. M., & Hicklin, D. J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*, 8(8), 579-591. doi: 10.1038/nrc2403
- Enríquez, J. A. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol*, 78, 533-561. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105031
- Espina, C., Herrero, R., Sankaranarayanan, R., Krug, E., Wild, C. P., & Schuz, J. (2018). Toward the World Code Against Cancer. *J Glob Oncol*(4), 1-8. doi: 10.1200/jgo.17.00145
- Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281(5381), 1317-1322.
- Evans, J. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R., & Morris, A. D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Br. Med. J.*, 330(7503), 1304-1305. doi: 10.1136/bmj.38415.708634.F7
- Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I. S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L. P., . . . Coukos, G. (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*, 475(7355), 226-230. doi: 10.1038/nature10169
- Farag, S. S., & Caligiuri, M. A. (2006). Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*, 20(3), 123-137. doi: 10.1016/j.blre.2005.10.001
- Faubert, B., Vincent, E. E., Poffenberger, M. C., & Jones, R. G. (2015). The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: many faces of a metabolic regulator. *Cancer Lett*, 356(2 Pt A), 165-170. doi: 10.1016/j.canlet.2014.01.018
- Feng, Y., Xiong, Y., Qiao, T., Li, X., Jia, L., & Han, Y. (2018). Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med*, 7(12), 6124-6136. doi: 10.1002/cam4.1820
- Ferrer, G., & Montserrat, E. (2018). Critical molecular pathways in CLL therapy. *Mol Med*, 24(1), 9. doi: 10.1186/s10020-018-0001-1
- Fife, C. M., McCarroll, J. A., & Kavallaris, M. (2014). Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br J Pharmacol*, 171(24), 5507-5523. doi: 10.1111/bph.12704
- Finn, O. J. (2018). The dawn of vaccines for cancer prevention. *Nat Rev Immunol*, 18(3), 183-194. doi: 10.1038/nri.2017.140

- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., . . . Kreutz, M. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109(9), 3812-3819. doi: 10.1182/blood-2006-07-035972
- Flavin, D. (2010). Medullary thyroid carcinoma relapse reversed with dichloroacetate: A case report. *Oncol Lett*, 1(5), 889-891. doi: 10.3892/ol\_00000158
- Flavin, D. F. (2010). Non-Hodgkin's Lymphoma Reversal with Dichloroacetate. *J Oncol*, 2010. doi: 10.1155/2010/414726
- Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P. L., & Loda, M. (2010). Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*, 6(4), 551-562. doi: 10.2217/fon.10.11
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 29(6 Suppl 16), 15-18. doi: 10.1053/sonc.2002.37263
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., & Viollet, B. (2014). Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*, 20(6), 953-966. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.018
- Foretz, M., Hebrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., . . . Viollet, B. (2010). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*, 120(7), 2355-2369. doi: 10.1172/jci40671
- Fraga, H., & Ventura, S. (2015). Influence of Cytoplasmatic Folding on Mitochondrial Import. *Curr Med Chem*, 22(19), 2349-2359.
- Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124(4), 619-626.
- Fu, Y., Liu, S., Yin, S., Niu, W., Xiong, W., Tan, M., . . . Zhou, M. (2017). The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. *Oncotarget*, 8(34), 57813-57825. doi: 10.18632/oncotarget.18175
- Fujii, T., Khawaja, M. R., DiNardo, C. D., Atkins, J. T., & Janku, F. (2016). Targeting isocitrate dehydrogenase (IDH) in cancer. *Discov Med*, 21(117), 373-380.
- Gallardo, M. E., Moreno-Loshuertos, R., Lopez, C., Casqueiro, M., Silva, J., Bonilla, F., . . . Enriquez, J. A. (2006). m.6267G>A: a recurrent mutation in the human mitochondrial DNA that reduces cytochrome c oxidase activity and is associated with tumors. *Hum Mutat*, 27(6), 575-582. doi: 10.1002/humu.20338

- Garaude, J., Cherni, S., Kaminski, S., Delepine, E., Chable-Bessia, C., Benkirane, M., . . . Villalba, M. (2006). ERK5 activates NF-kappaB in leukemic T cells and is essential for their growth in vivo. *J Immunol*, 177(11), 7607-7617.
- García-Bermúdez, J., & Cuezva, J. M. (2016). The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochim Biophys Acta*, 1857(8), 1167-1182. doi: 10.1016/j.bbabbio.2016.02.004
- Garon, E. B., Christofk, H. R., Hosmer, W., Britten, C. D., Bahng, A., Crabtree, M. J., . . . Slamon, D. J. (2014). Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140(3), 443-452. doi: 10.1007/s00432-014-1583-9
- Garrido, F., Algarra, I., & Garcia-Lora, A. M. (2010). The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunol Immunother*, 59(10), 1601-1606. doi: 10.1007/s00262-010-0893-2
- Garrido, F., Cabrera, T., & Aptsiauri, N. (2010). "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer*, 127(2), 249-256. doi: 10.1002/ijc.25270
- Gascón, M. (2017). Inmunoterapia de la Leucemia Linfática Crónica de células B con células NK expandidas. *Trabajo de Fin de Máster. Universidad de Zaragoza*.
- Gasparre, G., Porcelli, A. M., Lenaz, G., & Romeo, G. (2013). Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(2). doi: 10.1101/cshperspect.a011411
- Glentis, A., Oertle, P., Mariani, P., Chikina, A., El Marjou, F., Attieh, Y., . . . Vignjevic, D. M. (2017). Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nat Commun*, 8(1), 924. doi: 10.1038/s41467-017-00985-8
- Gonzalo, O. (2017). Las interacciones entre proteínas de la familia Bcl-2 como diana en terapia antitumoral: estudio mediante la técnica BiFC y aplicación de miméticos BH3 a la leucemia linfocítica crónica. *Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza*.
- Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Kletsas, D., Mariatos, G., Zoumpourlis, V., . . . Papavassiliou, A. G. (2003). p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-

- kappaB-independent manner. *Embo j*, 22(7), 1567-1578. doi: 10.1093/emboj/cdg157
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*, 12(12), 931-947. doi: 10.1038/nrd4002
- Gottlieb, E., & Vousden, K. H. (2010). p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(4), a001040. doi: 10.1101/cshperspect.a001040
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313. doi: 10.1038/nature10762
- Grizzi, F., & Chiriva-Internati, M. (2006). Cancer: looking for simplicity and finding complexity. *Cancer Cell Int*, 6, 4. doi: 10.1186/1475-2867-6-4
- Gros, A., Robbins, P. F., Yao, X., Li, Y. F., Turcotte, S., Tran, E., . . . Rosenberg, S. A. (2014). PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest*, 124(5), 2246-2259. doi: 10.1172/jci73639
- Grzybowska-Szatowska, L., & Slaska, B. (2014). Mitochondrial NADH dehydrogenase polymorphisms are associated with breast cancer in Poland. *J Appl Genet*, 55(2), 173-181. doi: 10.1007/s13353-013-0190-9
- Guha, M., & Avadhani, N. G. (2013). Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. *Mitochondrion*, 13(6), 577-591. doi: 10.1016/j.mito.2013.08.007
- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., & Gupte, S. S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr*, 18(5), 331-368.
- Hallek, M. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*, 92(9), 946-965. doi: 10.1002/ajh.24826
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., . . . Kipps, T. J. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111(12), 5446-5456. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906
- Han, J., Chu, J., Keung Chan, W., Zhang, J., Wang, Y., Cohen, J. B., . . . Yu, J. (2015). CAR-Engineered NK Cells Targeting Wild-Type EGFR and EGFRvIII Enhance Killing of



- Glioblastoma and Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells. *Sci Rep*, 5, 11483. doi: 10.1038/srep11483
- Han, S. Y., Jeong, Y. J., Choi, Y., Hwang, S. K., Bae, Y. S., & Chang, Y. C. (2018). Mitochondrial dysfunction induces the invasive phenotype, and cell migration and invasion, through the induction of AKT and AMPK pathways in lung cancer cells. *Int J Mol Med*, 42(3), 1644-1652. doi: 10.3892/ijmm.2018.3733
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harting, T., Stubbendorff, M., Willenbrock, S., Wagner, S., Schadzek, P., Ngezahayo, A., . . . Nolte, I. (2016). The effect of dichloroacetate in canine prostate adenocarcinomas and transitional cell carcinomas in vitro. *Int J Oncol*, 49(6), 2341-2350. doi: 10.3892/ijo.2016.3720
- Harting, T. P., Stubbendorff, M., Hammer, S. C., Schadzek, P., Ngezahayo, A., Murua Escobar, H., & Nolte, I. (2017). Dichloroacetate affects proliferation but not apoptosis in canine mammary cell lines. *PLoS One*, 12(6), e0178744. doi: 10.1371/journal.pone.0178744
- Hata, A. N., Engelman, J. A., & Faber, A. C. (2015). The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer Discov*, 5(5), 475-487. doi: 10.1158/2159-8290.cd-15-0011
- Hatefi, Y., Haavik, A. G., Fowler, L. R., & Griffiths, D. E. (1962). Studies on the electron transfer system. XLII. Reconstitution of the electron transfer system. *J Biol Chem*, 237, 2661-2669.
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., . . . Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*, 8(4), 311-321. doi: 10.1016/j.ccr.2005.09.008
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*, 62(11), 1180-1190.

- He, X., Zhou, A., Lu, H., Chen, Y., Huang, G., Yue, X., . . . Wu, Y. (2013). Suppression of mitochondrial complex I influences cell metastatic properties. *PLoS One*, 8(4), e61677. doi: 10.1371/journal.pone.0061677
- He, Y., & Tian, Z. (2017). NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands. *Cell Mol Immunol*, 14(4), 321-330. doi: 10.1038/cmi.2016.26
- Heerdt, B. G., Houston, M. A., & Augenlicht, L. H. (2005). The intrinsic mitochondrial membrane potential of colonic carcinoma cells is linked to the probability of tumor progression. *Cancer Res*, 65(21), 9861-9867. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-2444
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., . . . Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), 313-323. doi: 10.1016/j.stem.2007.06.002
- Heuer, T. S., Ventura, R., Mordec, K., Lai, J., Fridlib, M., Buckley, D., & Kemble, G. (2017). FASN Inhibition and Taxane Treatment Combine to Enhance Anti-tumor Efficacy in Diverse Xenograft Tumor Models through Disruption of Tubulin Palmitoylation and Microtubule Organization and FASN Inhibition-Mediated Effects on Oncogenic Signaling and Gene Expression. *EBioMedicine*, 16, 51-62. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.12.012
- Hoellenriegel, J., Meadows, S. A., Sivina, M., Wierda, W. G., Kantarjian, H., Keating, M. J., . . . Burger, J. A. (2011). The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 118(13), 3603-3612. doi: 10.1182/blood-2011-05-352492
- Hong, S. E., Kim, C. S., An, S., Kim, H. A., Hwang, S. G., Song, J. Y., . . . Park, I. C. (2016). TRAIL restores DCA/metformin-mediated cell death in hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 478(3), 1389-1395. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.134
- Hsu, C. C., Tseng, L. M., & Lee, H. C. (2016). Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Exp Biol Med (Maywood)*, 241(12), 1281-1295. doi: 10.1177/1535370216641787
- Huang, R. Y., Wong, M. K., Tan, T. Z., Kuay, K. T., Ng, A. H., Chung, V. Y., . . . Thiery, J. P. (2013). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis*, 4, e915. doi: 10.1038/cddis.2013.442

- Huber, V., Camisaschi, C., Berzi, A., Ferro, S., Lugini, L., Triulzi, T., . . . Rivoltini, L. (2017). Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Semin Cancer Biol*, 43, 74-89. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.03.001
- Hui, L., & Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett*, 368(1), 7-13. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.039
- Im, A., & Pavletic, S. Z. (2017). Immunotherapy in hematologic malignancies: past, present, and future. *J Hematol Oncol*, 10(1), 94. doi: 10.1186/s13045-017-0453-8
- Imanishi, H., Hattori, K., Wada, R., Ishikawa, K., Fukuda, S., Takenaga, K., . . . Hayashi, J. (2011). Mitochondrial DNA mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. *PLoS One*, 6(8), e23401. doi: 10.1371/journal.pone.0023401
- Ishiguro, T., Ishiguro, R., Ishiguro, M., & Iwai, S. (2012). Co-treatment of dichloroacetate, omeprazole and tamoxifen exhibited synergistically antiproliferative effect on malignant tumors: in vivo experiments and a case report. *Hepatogastroenterology*, 59(116), 994-996. doi: 10.5754/hge10507
- Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., . . . Hayashi, J. (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*, 320(5876), 661-664. doi: 10.1126/science.1156906
- Jahn, S. C., Solayman, M. H., Lorenzo, R. J., Langaee, T., Stacpoole, P. W., & James, M. O. (2016). GSTZ1 expression and chloride concentrations modulate sensitivity of cancer cells to dichloroacetate. *Biochim Biophys Acta*, 1860(6), 1202-1210. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.01.024
- James, M. O., Jahn, S. C., Zhong, G., Smeltz, M. G., Hu, Z., & Stacpoole, P. W. (2017). Therapeutic applications of dichloroacetate and the role of glutathione transferase zeta-1. *Pharmacol Ther*, 170, 166-180. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.10.018
- James, M. O., & Stacpoole, P. W. (2016). Pharmacogenetic considerations with dichloroacetate dosing. *Pharmacogenomics*, 17(7), 743-753. doi: 10.2217/pgs-2015-0012
- Jeon, S. M., Chandel, N. S., & Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, 485(7400), 661-665. doi: 10.1038/nature11066

- Jiang, L., Shestov, A. A., Swain, P., Yang, C., Parker, S. J., Wang, Q. A., . . . DeBerardinis, R. J. (2016). Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature*, 532(7598), 255-258. doi: 10.1038/nature17393
- Jolly, M. K., Ware, K. E., Gilja, S., Somarelli, J. A., & Levine, H. (2017). EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Mol Oncol*, 11(7), 755-769. doi: 10.1002/1878-0261.12083
- Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., . . . Thompson, C. B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 18(3), 283-293. doi: 10.1016/j.molcel.2005.03.027
- Kaelin, W. G., Jr., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, 30(4), 393-402. doi: 10.1016/j.molcel.2008.04.009
- Kaipparettu, B. A., Ma, Y., Park, J. H., Lee, T. L., Zhang, Y., Yotnda, P., . . . Wong, L. J. (2013). Crosstalk from non-cancerous mitochondria can inhibit tumor properties of metastatic cells by suppressing oncogenic pathways. *PLoS One*, 8(5), e61747. doi: 10.1371/journal.pone.0061747
- Kamarajugadda, S., Cai, Q., Chen, H., Nayak, S., Zhu, J., He, M., . . . Lu, J. (2013). Manganese superoxide dismutase promotes anoikis resistance and tumor metastasis. *Cell Death Dis*, 4, e504. doi: 10.1038/cddis.2013.20
- Kamarajugadda, S., Stemboroski, L., Cai, Q., Simpson, N. E., Nayak, S., Tan, M., & Lu, J. (2012). Glucose oxidation modulates anoikis and tumor metastasis. *Mol Cell Biol*, 32(10), 1893-1907. doi: 10.1128/mcb.06248-11
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., . . . Lyden, D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), 820-827. doi: 10.1038/nature04186
- Kapoor, C., Vaidya, S., Wadhwan, V., Kaur, G., & Pathak, A. (2016). Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther*, 12(1), 28-35. doi: 10.4103/0973-1482.157337
- Kato, Y., Ozawa, S., Tsukuda, M., Kubota, E., Miyazaki, K., St-Pierre, Y., & Hata, R. (2007). Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *Febs j*, 274(12), 3171-3183. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05848.x

- Kaufmann, P., Engelstad, K., Wei, Y., Jhung, S., Sano, M. C., Shungu, D. C., . . . De Vivo, D. C. (2006). Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology*, 66(3), 324-330. doi: 10.1212/01.wnl.0000196641.05913.27
- Keilin, D., & Hartree, E. F. (1947). Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations. *Biochem J*, 41(4), 500-502.
- Khan, A., Andrews, D., & Blackburn, A. C. (2016). Long-term stabilization of stage 4 colon cancer using sodium dichloroacetate therapy. *World J Clin Cases*, 4(10), 336-343. doi: 10.12998/wjcc.v4.i10.336
- Khan, A., Andrews, D., Shainhouse, J., & Blackburn, A. C. (2017). Long-term stabilization of metastatic melanoma with sodium dichloroacetate. *World J Clin Oncol*, 8(4), 371-377. doi: 10.5306/wjco.v8.i4.371
- Kim, Y., Suh, N., Sporn, M., & Reed, J. C. (2002). An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 277(25), 22320-22329. doi: 10.1074/jbc.M202458200
- King, M. P., & Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 246(4929), 500-503.
- Kinnaird, A., Dromparis, P., Saleme, B., Gurtu, V., Watson, K., Paulin, R., . . . Michelakis, E. D. (2016). Metabolic Modulation of Clear-cell Renal Cell Carcinoma with Dichloroacetate, an Inhibitor of Pyruvate Dehydrogenase Kinase. *Eur Urol*, 69(4), 734-744. doi: 10.1016/j.eururo.2015.09.014
- Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., . . . Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 16096. doi: 10.1038/nrdp.2016.96
- Kitamura, T., Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol*, 15(2), 73-86. doi: 10.1038/nri3789
- Kletsas, D., Pratsinis, H., Mariatos, G., Zacharatos, P., & Gorgoulis, V. G. (2004). The proinflammatory phenotype of senescent cells: the p53-mediated ICAM-1 expression. *Ann N Y Acad Sci*, 1019, 330-332. doi: 10.1196/annals.1297.056
- Koch, U., & Radtke, F. (2011). Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 539-562. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154008

- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., . . . Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), 903-907. doi: 10.1038/nature06309
- Kolesnik, D. L., Pyaskovskaya, O. N., Boychuk, I. V., Dasyukevich, O. I., Melnikov, O. R., Tarasov, A. S., & Solyanik, G. I. (2015). Effect of dichloroacetate on Lewis lung carcinoma growth and metastasis. *Exp Oncol*, 37(2), 126-129.
- Koniarczyk, H. L., Ferraro, C., & Miceli, T. (2017). Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs*, 33(3), 265-278. doi: 10.1016/j.soncn.2017.05.004
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11(5), 325-337. doi: 10.1038/nrc3038
- Koshikawa, N., Akimoto, M., Hayashi, J. I., & Nagase, H. (2017). Association of predicted pathogenic mutations in mitochondrial ND genes with distant metastasis in NSCLC and colon cancer. 7(1), 15535. doi: 10.1038/s41598-017-15592-2
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Harris, A. L., & Sivridis, E. (2006). Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res*, 66(2), 632-637. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-3260
- Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Huang, X., Turner, B., Bubendorf, L., . . . Reed, J. C. (2003). Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 9(13), 4914-4925.
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(7), 393-405. doi: 10.1038/nrm4007
- Kulawiec, M., Owens, K. M., & Singh, K. K. (2009). Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis. *Cancer Biol Ther*, 8(14), 1378-1385.
- Kumar, S. K., Rajkumar, V., Kyle, R. A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M. V., . . . Anderson, K. C. (2017). Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17046. doi: 10.1038/nrdp.2017.46
- Lam, E. T., Bracci, P. M., Holly, E. A., Chu, C., Poon, A., Wan, E., . . . Tranah, G. J. (2012). Mitochondrial DNA sequence variation and risk of pancreatic cancer. *Cancer Res*, 72(3), 686-695. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-1682

- Landau, B. R., Laszlo, J., Stengle, J., & Burk, D. (1958). Certain metabolic and pharmacologic effects in cancer patients given infusions of 2-deoxy-D-glucose. *J Natl Cancer Inst*, 21(3), 485-494.
- Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J. A., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., . . . Rajkumar, S. V. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 113(22), 5412-5417. doi: 10.1182/blood-2008-12-194241
- Langaee, T., Wagner, R., Horne, L. P., Lawson, L. A., Becker, C., Shahin, M., . . . Stacpoole, P. W. (2018). Personalized Dosing of Dichloroacetate Using GSTZ1 Clinical Genotyping Assay. *Genet Test Mol Biomarkers*, 22(4), 266-269. doi: 10.1089/gtmb.2017.0261
- Laplanche, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017
- Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., . . . Enriquez, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*, 340(6140), 1567-1570. doi: 10.1126/science.1230381
- LeBleu, V. S., O'Connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., . . . Kalluri, R. (2014). PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*, 16(10), 992-1003, 1001-1015. doi: 10.1038/ncb3039
- Lee, H., & Yoon, Y. (2016). Mitochondrial fission and fusion. *Biochem Soc Trans*, 44(6), 1725-1735. doi: 10.1042/bst20160129
- Lee, J. H., Lee, Y. K., Lim, J. J., Byun, H. O., Park, I., Kim, G. H., . . . Yoon, G. (2015). Mitochondrial Respiratory Dysfunction Induces Claudin-1 Expression via Reactive Oxygen Species-mediated Heat Shock Factor 1 Activation, Leading to Hepatoma Cell Invasiveness. *J Biol Chem*, 290(35), 21421-21431. doi: 10.1074/jbc.M115.654913
- Lee, M., & Yoon, J. H. (2015). Metabolic interplay between glycolysis and mitochondrial oxidation: The reverse Warburg effect and its therapeutic implication. *World J Biol Chem*, 6(3), 148-161. doi: 10.4331/wjbc.v6.i3.148
- Leong, H. S., Robertson, A. E., Stoletov, K., Leith, S. J., Chin, C. A., Chien, A. E., . . . Lewis, J. D. (2014). Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a

- therapeutic target for metastasis. *Cell Rep*, 8(5), 1558-1570. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.050
- Li, L. D., Sun, H. F., Liu, X. X., Gao, S. P., Jiang, H. L., Hu, X., & Jin, W. (2015). Down-Regulation of NDUF9 Promotes Breast Cancer Cell Proliferation, Metastasis by Mediating Mitochondrial Metabolism. *PLoS One*, 10(12), e0144441. doi: 10.1371/journal.pone.0144441
- Li, L. H., Kang, T., Chen, L., Zhang, W., Liao, Y., Chen, J., & Shi, Y. (2014). Detection of mitochondrial DNA mutations by high-throughput sequencing in the blood of breast cancer patients. *Int J Mol Med*, 33(1), 77-82. doi: 10.3892/ijmm.2013.1559
- Lin, G., Hill, D. K., Andrejeva, G., Boulton, J. K., Troy, H., Fong, A. C., . . . Chung, Y. L. (2014). Dichloroacetate induces autophagy in colorectal cancer cells and tumours. *Br J Cancer*, 111(2), 375-385. doi: 10.1038/bjc.2014.281
- Liu, D., Liu, S., Jing, X., Li, X., Li, W., & Huang, Y. (2012). Necrosis of cervical carcinoma by dichloroacetate released from electrospun polylactide mats. *Biomaterials*, 33(17), 4362-4369. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.062
- Liu, J., Chen, G., Liu, Z., Liu, S., Cai, Z., You, P., . . . Wang, F. (2018). Aberrant FGFR Tyrosine Kinase Signaling Enhances the Warburg Effect by Reprogramming LDH Isoform Expression and Activity in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 78(16), 4459-4470. doi: 10.1158/0008-5472.can-17-3226
- Liu, S., Sun, M. Z., Tang, J. W., Wang, Z., Sun, C., & Greenaway, F. T. (2008). High-performance liquid chromatography/nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry, two-dimensional difference in-gel electrophoresis and gene microarray identification of lymphatic metastasis-associated biomarkers. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22(20), 3172-3178. doi: 10.1002/rcm.3725
- Liu, Y., & Cao, X. (2016a). Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell*, 30(5), 668-681. doi: 10.1016/j.ccell.2016.09.011
- Liu, Y., & Cao, X. (2016b). Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. *J Mol Med (Berl)*, 94(5), 509-522. doi: 10.1007/s00109-015-1376-x
- Lobo-Jarne, T., & Ugalde, C. (2018). Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 76, 179-190. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.021
- Locasale, J. W., Grassian, A. R., Melman, T., Lyssiotis, C. A., Mattaini, K. R., Bass, A. J., . . . Vander Heiden, M. G. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic



- flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet*, 43(9), 869-874. doi: 10.1038/ng.890
- Long, E. O., Kim, H. S., Liu, D., Peterson, M. E., & Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*, 31, 227-258. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., . . . Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834-838. doi: 10.1038/nature03702
- Lu, J., Tan, M., & Cai, Q. (2015). The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett*, 356(2 Pt A), 156-164. doi: 10.1016/j.canlet.2014.04.001
- Luengo, A., Gui, D. Y., & Vander Heiden, M. G. (2017). Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol*, 24(9), 1161-1180. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.08.028
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., & Groom, A. C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*, 153(3), 865-873. doi: 10.1016/s0002-9440(10)65628-3
- Lynch, C. C., & Matrisian, L. M. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation*, 70(9-10), 561-573. doi: 10.1046/j.1432-0436.2002.700909.x
- Ma, J., Zhang, Q., Chen, S., Fang, B., Yang, Q., Chen, C., . . . Wang, Z. (2013). Mitochondrial dysfunction promotes breast cancer cell migration and invasion through HIF1alpha accumulation via increased production of reactive oxygen species. *PLoS One*, 8(7), e69485. doi: 10.1371/journal.pone.0069485
- Madhok, B. M., Yeluri, S., Perry, S. L., Hughes, T. A., & Jayne, D. G. (2010). Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*, 102(12), 1746-1752. doi: 10.1038/sj.bjc.6605701
- Madiraju, A. K., Erion, D. M., Rahimi, Y., Zhang, X. M., Braddock, D. T., Albright, R. A., . . . Shulman, G. I. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 510(7506), 542-546. doi: 10.1038/nature13270

- Marco, J. (2015). Efecto del metabolismo glucídico sobre la supervivencia y proliferación de los tumores. *Trabajo de Fin de Máster. Universidad de Zaragoza*.
- Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., . . . Trowsdale, J. (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, 75(4), 291-455. doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x
- Martínez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Gamen, S., Monleón, I., Lasierra, P., Larrad, L., . . . Naval, J. (1999). Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol*, 163(3), 1274-1281.
- Martínez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Monleón, I., Sierra, J. J., Piñeiro, A., Naval, J., & Álava, M. A. (2000). Tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase correlates with high proliferation rates in sublines derived from the Jurkat leukemia. *Int J Biochem Cell Biol*, 32(4), 435-445.
- Martínez-Lostao, L., Anel, A., & Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res*, 21(22), 5047-5056. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-15-0685
- Martínez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pagès, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(1), 11-31. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.60
- Matsuyama, W., Nakagawa, M., Wakimoto, J., Hirotsu, Y., Kawabata, M., & Osame, M. (2003). Mitochondrial DNA mutation correlates with stage progression and prognosis in non-small cell lung cancer. *Hum Mutat*, 21(4), 441-443. doi: 10.1002/humu.10196
- Mattaini, K. R., Sullivan, M. R., & Vander Heiden, M. G. (2016). The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol*, 214(3), 249-257. doi: 10.1083/jcb.201604085
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12, 991-1045. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.005015
- Mauro-Lizcano, M., & López-Rivas, A. (2018). Glutamine metabolism regulates FLIP expression and sensitivity to TRAIL in triple-negative breast cancer cells. *Cell Death Dis*, 9(2), 205. doi: 10.1038/s41419-018-0263-0
- McCall, C. E., Zabalawi, M., Liu, T., Martin, A., Long, D. L., Buechler, N. L., . . . Vachharajani, V. (2018). Pyruvate dehydrogenase complex stimulation promotes immunometabolic homeostasis and sepsis survival. *JCI Insight*, 3(15). doi: 10.1172/jci.insight.99292

- McHayleh, W., Bedi, P., Sehgal, R., & Solh, M. (2019). Chimeric Antigen Receptor T-Cells: The Future is Now. *J Clin Med*, 8(2). doi: 10.3390/jcm8020207
- Menegon, S., Columbano, A., & Giordano, S. (2016). The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol Med*, 22(7), 578-593. doi: 10.1016/j.molmed.2016.05.002
- Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P., Shete, S., Naftalis, E. Z., Huth, J. F., . . . Uhr, J. W. (2004). Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*, 10(24), 8152-8162. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-1110
- Metallo, C. M., Gameiro, P. A., Bell, E. L., Mattaini, K. R., Yang, J., Hiller, K., . . . Stephanopoulos, G. (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481(7381), 380-384. doi: 10.1038/nature10602
- Michelakis, E. D., Gurtu, V., Webster, L., Barnes, G., Watson, G., Howard, L., . . . Wilkins, M. R. (2017). Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves pulmonary arterial hypertension in genetically susceptible patients. *Sci Transl Med*, 9(413). doi: 10.1126/scitranslmed.aao4583
- Michelakis, E. D., Webster, L., & Mackey, J. R. (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer*, 99(7), 989-994. doi: 10.1038/sj.bjc.6604554
- Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G., & Attardi, G. (1999). Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*, 286(5440), 774-779.
- Mierke, C. T., Fischer, T., Puder, S., Kunschmann, T., Soetje, B., & Ziegler, W. H. (2017). Focal adhesion kinase activity is required for actomyosin contractility-based invasion of cells into dense 3D matrices. *Sci Rep*, 7, 42780. doi: 10.1038/srep42780
- Molon, B., Cali, B., & Viola, A. (2016). T Cells and Cancer: How Metabolism Shapes Immunity. *Front Immunol*, 7, 20. doi: 10.3389/fimmu.2016.00020
- Montoya, J. (2010). Del Genoma Mitocondrial a la Enfermedad. *Prensas Universitarias de Zaragoza*.
- Montoya, J., López-Pérez, M. J., & Ruiz-Pesini, E. (2006). Mitochondrial DNA transcription and diseases: past, present and future. *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10), 1179-1189. doi: 10.1016/j.bbabbio.2006.03.023

- Morris, L. G., & Chan, T. A. (2015). Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*, 121(9), 1357-1368. doi: 10.1002/cncr.29140
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*, 16(1), 7-19. doi: 10.1038/nrc.2015.5
- Muntasell, A., Ochoa, M. C., Cordeiro, L., Berraondo, P., Lopez-Diaz de Cerio, A., Cabo, M., . . . Melero, I. (2017). Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 45, 73-81. doi: 10.1016/j.coi.2017.01.003
- Muñoz-Piñedo, C., El Mjiyad, N., & Ricci, J. E. (2012). Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis*, 3, e248. doi: 10.1038/cddis.2011.123
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), 355-365.
- Neuman, R. E., & McCoy, T. A. (1956). Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 in vitro for asparagine and glutamine. *Science*, 124(3212), 124-125.
- Ngan, C. Y., Yamamoto, H., Seshimo, I., Tsujino, T., Man-i, M., Ikeda, J. I., . . . Monden, M. (2007). Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Br J Cancer*, 96(6), 986-992. doi: 10.1038/sj.bjc.6603651
- Nguyen, S., Béziat, V., Norol, F., Uzunov, M., Trebeden-Negre, H., Azar, N., . . . Dhédin, N. (2011). Infusion of allogeneic natural killer cells in a patient with acute myeloid leukemia in relapse after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion*, 51(8), 1769-1778. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.03058.x
- Ni Chonghaile, T., Sarosiek, K. A., Vo, T. T., Ryan, J. A., Tammareddi, A., Moore Vdel, G., . . . Letai, A. (2011). Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science*, 334(6059), 1129-1133. doi: 10.1126/science.1206727
- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine. (2018). Disponible en: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/summary/>.
- Nowell, P. C. (1986). Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res*, 46(5), 2203-2207.
- Nunes, J. B., Peixoto, J., Soares, P., Maximo, V., Carvalho, S., Pinho, S. S., . . . Lima, J. (2015). OXPHOS dysfunction regulates integrin-beta1 modifications and enhances cell

- motility and migration. *Hum Mol Genet*, 24(7), 1977-1990. doi: 10.1093/hmg/ddu612
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145-1159. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035
- Oliveras-Ferraro, C., Cufi, S., Vazquez-Martin, A., Menendez, O. J., Bosch-Barrera, J., Martin-Castillo, B., . . . Menendez, J. A. (2012). Metformin rescues cell surface major histocompatibility complex class I (MHC-I) deficiency caused by oncogenic transformation. *Cell Cycle*, 11(5), 865-870. doi: 10.4161/cc.11.5.19252
- Oppenheimer, S. B. (2006). Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem*, 108(5), 327-334. doi: 10.1016/j.acthis.2006.03.008
- Orita, H., Coulter, J., Lemmon, C., Tully, E., Vadlamudi, A., Medghalchi, S. M., . . . Gabrielson, E. (2007). Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 13(23), 7139-7145. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-1186
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*, 8(2), 98-101.
- Palumbo, A., Chanan-Khan, A., Weisel, K., Nooka, A. K., Masszi, T., Beksac, M., . . . Sonneveld, P. (2016). Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 375(8), 754-766. doi: 10.1056/NEJMoa1606038
- Pandolfi, P. P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F., & Luzzatto, L. (1995). Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *Embo j*, 14(21), 5209-5215.
- Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3481-3498. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026
- Pardo, J., Aguiló, J. I., Anel, A., Martin, P., Joeckel, L., Borner, C., . . . Simon, M. M. (2009). The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect*, 11(4), 452-459. doi: 10.1016/j.micinf.2009.02.004
- Pardo, J., Bosque, A., Brehm, R., Wallich, R., Naval, J., Mullbacher, A., . . . Simon, M. M. (2004). Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or

- granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol*, 167(3), 457-468. doi: 10.1083/jcb.200406115
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., . . . Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 556(7702), 463-468. doi: 10.1038/s41586-018-0040-3
- Patel, S. P., & Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*, 14(4), 847-856. doi: 10.1158/1535-7163.mct-14-0983
- Pavrides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., . . . Lisanti, M. P. (2009). The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 8(23), 3984-4001. doi: 10.4161/cc.8.23.10238
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 23(1), 27-47. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.006
- Payen, V. L., Porporato, P. E., Baselet, B., & Sonveaux, P. (2016). Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(7), 1333-1348. doi: 10.1007/s00018-015-2098-5
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7(6), 415-428. doi: 10.1038/nrc2131
- Peiris-Pagès, M., Martínez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2015). Metastasis and Oxidative Stress: Are Antioxidants a Metabolic Driver of Progression? *Cell Metab*, 22(6), 956-958. doi: 10.1016/j.cmet.2015.11.008
- Pernicova, I., & Korbonits, M. (2014). Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, 10, 143. doi: 10.1038/nrendo.2013.256
- Peters, G. J. (2014). Novel developments in the use of antimetabolites. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 33(4-6), 358-374. doi: 10.1080/15257770.2014.894197
- Piskounova, E., Agathocleous, M., Murphy, M. M., Hu, Z., Huddlestun, S. E., Zhao, Z., . . . Morrison, S. J. (2015). Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*, 527(7577), 186-191. doi: 10.1038/nature15726

- Ploumi, C., Daskalaki, I., & Tavernarakis, N. (2017). Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *Febs j*, 284(2), 183-195. doi: 10.1111/febs.13820
- Polanski, R., Hodgkinson, C. L., Fusi, A., Nonaka, D., Priest, L., Kelly, P., . . . Morrow, C. J. (2014). Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 20(4), 926-937. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-2270
- Porporato, P. E., Filigheddu, N., Pedro, J. M. B., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2018). Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res*, 28(3), 265-280. doi: 10.1038/cr.2017.155
- Porporato, P. E., Payen, V. L., Baselet, B., & Sonveaux, P. (2016). Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 2: Mitochondria, lipid and amino acid metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(7), 1349-1363. doi: 10.1007/s00018-015-2100-2
- Porporato, P. E., Payen, V. L., Perez-Escuredo, J., De Saedeleer, C. J., Danhier, P., Copetti, T., . . . Sonveaux, P. (2014). A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep*, 8(3), 754-766. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.043
- Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., & June, C. H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 365(8), 725-733. doi: 10.1056/NEJMoa1103849
- Prior, S. L., Griffiths, A. P., Baxter, J. M., Baxter, P. W., Hodder, S. C., Silvester, K. C., & Lewis, P. D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 27(5), 945-950. doi: 10.1093/carcin/bgi326
- Raez, L. E., Papadopoulos, K., Ricart, A. D., Chiorean, E. G., Dipaola, R. S., Stein, M. N., . . . Lampidis, T. J. (2013). A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71(2), 523-530. doi: 10.1007/s00280-012-2045-1
- Rai, K. R., & Jain, P. (2016). Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am J Hematol*, 91(3), 330-340. doi: 10.1002/ajh.24282
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M. V., . . . Miguel, J. F. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15(12), e538-548. doi: 10.1016/s1470-2045(14)70442-5

- Ramjaun, A. R., & Downward, J. (2007). Ras and phosphoinositide 3-kinase: partners in development and tumorigenesis. *Cell Cycle*, 6(23), 2902-2905.
- Reitzer, L. J., Wice, B. M., & Kennell, D. (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem*, 254(8), 2669-2676.
- Relf, M., LeJeune, S., Scott, P. A., Fox, S., Smith, K., Leek, R., . . . Harris, A. L. (1997). Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res*, 57(5), 963-969.
- Richardson, P. G., Bensinger, W. I., Huff, C. A., Costello, C. L., Lendvai, N., Berdeja, J. G., . . . Vij, R. (2018). Ibrutinib alone or with dexamethasone for relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: phase 2 trial results. *Br J Haematol*, 180(6), 821-830. doi: 10.1111/bjh.15058
- Riera Romo, M., Perez-Martinez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148(2), 125-139. doi: 10.1111/imm.12597
- Rodriguez-Otero, P., Paiva, B., Engelhardt, M., Prosper, F., & San Miguel, J. F. (2017). Is immunotherapy here to stay in multiple myeloma? *Haematologica*, 102(3), 423-432. doi: 10.3324/haematol.2016.152504
- Röllig, C., Knop, S., & Bornhauser, M. (2015). Multiple myeloma. *Lancet*, 385(9983), 2197-2208. doi: 10.1016/s0140-6736(14)60493-1
- Rosenberg, S. A., Spiess, P., & Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*, 233(4770), 1318-1321.
- Roth, J. A., Sullivan, S. D., Lin, V. W., Bansal, A., Purdum, A. G., Navale, L., . . . Ramsey, S. D. (2018). Cost-effectiveness of axicabtagene ciloleucel for adult patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma in the United States. *J Med Econ*, 21(12), 1238-1245. doi: 10.1080/13696998.2018.1529674
- Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G., & Sloane, B. F. (1994). Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res*, 54(24), 6517-6525.



- Rubartelli, A., & Lotze, M. T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*, 28(10), 429-436. doi: 10.1016/j.it.2007.08.004
- Ruefli-Brasse, A., & Reed, J. C. (2017). Therapeutics targeting Bcl-2 in hematological malignancies. *Biochem J*, 474(21), 3643-3657. doi: 10.1042/bcj20170080
- Sánchez-Martínez, D., Allende-Vega, N., Orecchioni, S., Talarico, G., Cornillon, A., Vo, D. N., . . . Villalba, M. (2018). Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors. *Theranostics*, 8(14), 3856-3869. doi: 10.7150/thno.25149
- Sánchez-Martínez, D., Lanuza, P. M., Gómez, N., Muntasell, A., Cisneros, E., Moraru, M., . . . Pardo, J. (2016). Activated Allogeneic NK Cells Preferentially Kill Poor Prognosis B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Front Immunol*, 7, 454. doi: 10.3389/fimmu.2016.00454
- Sanchez, W. Y., McGee, S. L., Connor, T., Mottram, B., Wilkinson, A., Whitehead, J. P., . . . Catley, L. (2013). Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib. *Br J Cancer*, 108(8), 1624-1633. doi: 10.1038/bjc.2013.120
- Sancho, P., Barneda, D., & Heeschen, C. (2016). Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer*, 114(12), 1305-1312. doi: 10.1038/bjc.2016.152
- Santidrian, A. F., Matsuno-Yagi, A., Ritland, M., Seo, B. B., LeBoeuf, S. E., Gay, L. J., . . . Felding-Habermann, B. (2013). Mitochondrial complex I activity and NAD<sup>+</sup>/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest*, 123(3), 1068-1081. doi: 10.1172/jci64264
- Schafer, Z. T., Grassian, A. R., Song, L., Jiang, Z., Gerhart-Hines, Z., Irie, H. Y., . . . Brugge, J. S. (2009). Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, 461(7260), 109-113. doi: 10.1038/nature08268
- Schägger, H., Bentlage, H., Ruitenbeek, W., Pfeiffer, K., Rotter, S., Rother, C., . . . Lodemann, E. (1996). Electrophoretic separation of multiprotein complexes from blood platelets and cell lines: technique for the analysis of diseases with defects in oxidative phosphorylation. *Electrophoresis*, 17(4), 709-714. doi: 10.1002/elps.1150170415
- Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo j*, 19(8), 1777-1783. doi: 10.1093/emboj/19.8.1777

- Schägger, H., & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 199(2), 223-231.
- Scheel, C., Onder, T., Karnoub, A., & Weinberg, R. A. (2007). Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior. *Cancer Res*, 67(24), 11476-11479; discussion 11479-11480. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-1653
- Schexnayder, C., Broussard, K., Onuaguluchi, D., Poche, A., Ismail, M., McAtee, L., . . . Williams, C. (2018). Metformin Inhibits Migration and Invasion by Suppressing ROS Production and COX2 Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 19(11). doi: 10.3390/ijms19113692
- Schmiedel, D., & Mandelboim, O. (2018). NKG2D Ligands-Critical Targets for Cancer Immune Escape and Therapy. *Front Immunol*, 9, 2040. doi: 10.3389/fimmu.2018.02040
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024), 1565-1570. doi: 10.1126/science.1203486
- Sharma, P., & Allison, J. P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348(6230), 56-61. doi: 10.1126/science.aaa8172
- Shay, J. W., & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 33(5), 787-791. doi: 10.1016/s0959-8049(97)00062-2
- Shi, Q., Le, X., Wang, B., Abbruzzese, J. L., Xiong, Q., He, Y., & Xie, K. (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene*, 20(28), 3751-3756. doi: 10.1038/sj.onc.1204500
- Simpson, C. D., Anyiwe, K., & Schimmer, A. D. (2008). Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett*, 272(2), 177-185. doi: 10.1016/j.canlet.2008.05.029
- Singh, M., Yelle, N., Venugopal, C., & Singh, S. K. (2018). EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*, 182, 80-94. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.009
- Singh, R. K., Srivastava, A., Kalaiarasan, P., Manvati, S., Chopra, R., & Bamezai, R. N. (2014). mtDNA germ line variation mediated ROS generates retrograde signaling and induces pro-cancerous metabolic features. *Sci Rep*, 4, 6571. doi: 10.1038/srep06571

- Singh, S., Kumar, N. K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P., & Chugh, V. K. (2018). Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr Clin Pharmacol*, 13(2), 85-99. doi: 10.2174/1574884712666170809124728
- Sliwkowski, M. X., & Mellman, I. (2013). Antibody therapeutics in cancer. *Science*, 341(6151), 1192-1198. doi: 10.1126/science.1241145
- Smith, A., Howell, D., Patmore, R., Jack, A., & Roman, E. (2011). Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*, 105(11), 1684-1692. doi: 10.1038/bjc.2011.450
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM): Las Cifras del Cáncer en España. 2018. Disponible en: [https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las\\_Cifras\\_del\\_cancer\\_en\\_Espana2018.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf).
- Soriani, A., Borrelli, C., Ricci, B., Molfetta, R., Zingoni, A., Fionda, C., . . . Santoni, A. (2017). p38 MAPK differentially controls NK activating ligands at transcriptional and post-transcriptional level on multiple myeloma cells. *Oncotmunology*, 6(1), e1264564. doi: 10.1080/2162402x.2016.1264564
- Sotgia, F., Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U. E., Flomenberg, N., Birbe, R. C., Witkiewicz, A. K., . . . Lisanti, M. P. (2012). Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the "reverse Warburg effect" in positive lymph node tissue. *Cell Cycle*, 11(7), 1445-1454. doi: 10.4161/cc.19841
- Srinivasan, S., Guha, M., Dong, D. W., Whelan, K. A., Ruthel, G., Uchikado, Y., . . . Avadhani, N. G. (2015). Disruption of cytochrome c oxidase function induces the Warburg effect and metabolic reprogramming. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2015.227
- Stacpoole, P. W., Kurtz, T. L., Han, Z., & Langaee, T. (2008). Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(13-14), 1478-1487. doi: 10.1016/j.addr.2008.02.014
- Stacpoole, P. W., Lorenz, A. C., Thomas, R. G., & Harman, E. M. (1988). Dichloroacetate in the treatment of lactic acidosis. *Ann Intern Med*, 108(1), 58-63.
- Stacpoole, P. W., Moore, G. W., & Kornhauser, D. M. (1978). Metabolic effects of dichloroacetate in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med*, 298(10), 526-530. doi: 10.1056/nejm197803092981002

- Steeg, P. S. (2016). Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 16(4), 201-218. doi: 10.1038/nrc.2016.25
- Stephenne, X., Foretz, M., Taleux, N., van der Zon, G. C., Sokal, E., Hue, L., . . . Guigas, B. (2011). Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia*, 54(12), 3101-3110. doi: 10.1007/s00125-011-2311-5
- Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet*, 16(9), 530-542. doi: 10.1038/nrg3966
- Stilgenbauer, S., Eichhorst, B., Schetelig, J., Coutre, S., Seymour, J. F., Munir, T., . . . Wierda, W. G. (2016). Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 17(6), 768-778. doi: 10.1016/s1470-2045(16)30019-5
- Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., & Griffiths, G. M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*, 15(5), 751-761.
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L., & Dang, C. V. (2015). MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov*, 5(10), 1024-1039. doi: 10.1158/2159-8290.cd-15-0507
- Stock, D., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286(5445), 1700-1705.
- Stockwin, L. H., Yu, S. X., Borgel, S., Hancock, C., Wolfe, T. L., Phillips, L. R., . . . Newton, D. L. (2010). Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int J Cancer*, 127(11), 2510-2519. doi: 10.1002/ijc.25499
- Stresing, V., Baltziskueta, E., Rubio, N., Blanco, J., Arriba, M. C., Valls, J., . . . Sierra, A. (2013). Peroxiredoxin 2 specifically regulates the oxidative and metabolic stress response of human metastatic breast cancer cells in lungs. *Oncogene*, 32(6), 724-735. doi: 10.1038/onc.2012.93
- Strilic, B., & Offermanns, S. (2017). Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell*, 32(3), 282-293. doi: 10.1016/j.ccell.2017.07.001
- Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, 1(2), 1-4. doi: 10.4172/1948-5956.100000e2

- Sugiura, A., McLelland, G. L., Fon, E. A., & McBride, H. M. (2014). A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *Embo j*, 33(19), 2142-2156. doi: 10.15252/embj.201488104
- Sun, R. C., Fadia, M., Dahlstrom, J. E., Parish, C. R., Board, P. G., & Blackburn, A. C. (2010). Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat*, 120(1), 253-260. doi: 10.1007/s10549-009-0435-9
- Sun, W., Zhou, S., Chang, S. S., McFate, T., Verma, A., & Califano, J. A. (2009). Mitochondrial mutations contribute to HIF1alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 15(2), 476-484. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-08-0930
- Svensson, R. U., Parker, S. J., Eichner, L. J., Kolar, M. J., Wallace, M., Brun, S. N., . . . Shaw, R. J. (2016). Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. *Nat Med*, 22(10), 1108-1119. doi: 10.1038/nm.4181
- Swietach, P., Vaughan-Jones, R. D., & Harris, A. L. (2007). Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev*, 26(2), 299-310. doi: 10.1007/s10555-007-9064-0
- Talekar, M., Boreddy, S. R., Singh, A., & Amiji, M. (2014). Tumor aerobic glycolysis: new insights into therapeutic strategies with targeted delivery. *Expert Opin Biol Ther*, 14(8), 1145-1159. doi: 10.1517/14712598.2014.912270
- Tam, W. L., & Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*, 19(11), 1438-1449. doi: 10.1038/nm.3336
- Tan, A. S., Baty, J. W., Dong, L. F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., . . . Berridge, M. V. (2015). Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab*, 21(1), 81-94. doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.003
- Tan, D. J., Bai, R. K., & Wong, L. J. (2002). Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 62(4), 972-976.
- Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2017). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*, 27(1), 109-118. doi: 10.1038/cr.2016.151

- Tanaka, R., Tomosugi, M., Horinaka, M., Sowa, Y., & Sakai, T. (2015). Metformin Causes G1-Phase Arrest via Down-Regulation of MiR-221 and Enhances TRAIL Sensitivity through DR5 Up-Regulation in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One*, 10(5), e0125779. doi: 10.1371/journal.pone.0125779
- Tateishi, K., Wakimoto, H., Iafrate, A. J., Tanaka, S., Loebel, F., Lelic, N., . . . Cahill, D. P. (2015). Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD<sup>+</sup> Depletion. *Cancer Cell*, 28(6), 773-784. doi: 10.1016/j.ccell.2015.11.006
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(3), 231-241. doi: 10.1038/nrm2312
- Textor, S., Fiegler, N., Arnold, A., Porgador, A., Hofmann, T. G., & Cerwenka, A. (2011). Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Res*, 71(18), 5998-6009. doi: 10.1158/0008-5472.can-10-3211
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(2), 131-142. doi: 10.1038/nrm1835
- Torrano, V., Valcarcel-Jimenez, L., Cortazar, A. R., Liu, X., Urosevic, J., Castillo-Martin, M., . . . Carracedo, A. (2016). The metabolic co-regulator PGC1alpha suppresses prostate cancer metastasis. doi: 10.1038/ncb3357
- Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., . . . Domenicotti, C. (2013). Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 972913. doi: 10.1155/2013/972913
- Urrea, F. A., Muñoz, F., Lovy, A., & Cárdenas, C. (2017). The Mitochondrial Complex(I)ty of Cancer. *Front Oncol*, 7, 118. doi: 10.3389/fonc.2017.00118
- Valcárcel-Jiménez, L., Gaude, E., Torrano, V., Frezza, C., & Carracedo, A. (2017). Mitochondrial Metabolism: Yin and Yang for Tumor Progression. *Trends Endocrinol Metab*, 28(10), 748-757. doi: 10.1016/j.tem.2017.06.004
- Valencia, T., Kim, J. Y., Abu-Baker, S., Moscat-Pardos, J., Ahn, C. S., Reina-Campos, M., . . . Moscat, J. (2014). Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-mTORC1 signaling promotes inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 26(1), 121-135. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.004

- Vancura, A., Bu, P., Bhagwat, M., Zeng, J., & Vancurova, I. (2018). Metformin as an Anticancer Agent. *Trends Pharmacol Sci*. doi: 10.1016/j.tips.2018.07.006
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. doi: 10.1126/science.1160809
- Vander Heiden, M. G., & DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 168(4), 657-669. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.039
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., . . . Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937-951. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262
- Vella, S., Conti, M., Tasso, R., Cancedda, R., & Pagano, A. (2012). Dichloroacetate inhibits neuroblastoma growth by specifically acting against malignant undifferentiated cells. *Int J Cancer*, 130(7), 1484-1493. doi: 10.1002/ijc.26173
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 29, 235-271. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324
- Villalba, M., López-Royuela, N., Krzywinska, E., Rathore, M. G., Hipskind, R. A., Haouas, H., & Allende-Vega, N. (2014). Chemical metabolic inhibitors for the treatment of blood-borne cancers. *Anticancer Agents Med Chem*, 14(2), 223-232.
- Vivian, C. J., Brinker, A. E., Graw, S., Koestler, D. C., Legendre, C., Gooden, G. C., . . . Welch, D. R. (2017). Mitochondrial Genomic Backgrounds Affect Nuclear DNA Methylation and Gene Expression. *Cancer Res*, 77(22), 6202-6214. doi: 10.1158/0008-5472.can-17-1473
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, 9(4), 138-141.
- Voltan, R., Rimondi, E., Melloni, E., Gilli, P., Bertolasi, V., Casciano, F., . . . Secchiero, P. (2016). Metformin combined with sodium dichloroacetate promotes B leukemic cell death by suppressing anti-apoptotic protein Mcl-1. *Oncotarget*, 7(14), 18965-18977. doi: 10.18632/oncotarget.7879
- Voltan, R., Rimondi, E., Melloni, E., Rigolin, G. M., Casciano, F., Arcidiacono, M. V., . . . Secchiero, P. (2016). Ibrutinib synergizes with MDM-2 inhibitors in promoting

- cytotoxicity in B chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.12139
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*, 15(6), 388-400. doi: 10.1038/nri3839
- Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M. C. (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell*, 166(3), 555-566. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.002
- Waldmann, T. A. (2018). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(12). doi: 10.1101/cshperspect.a028472
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*, 12(10), 685-698. doi: 10.1038/nrc3365
- Wang, J. B., Erickson, J. W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., . . . Cerione, R. A. (2010). Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*, 18(3), 207-219. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.009
- Wang, J. W., Peng, S. Y., Li, J. T., Wang, Y., Zhang, Z. P., Cheng, Y., . . . Liu, Y. B. (2009). Identification of metastasis-associated proteins involved in gallbladder carcinoma metastasis by proteomic analysis and functional exploration of chloride intracellular channel 1. *Cancer Lett*, 281(1), 71-81. doi: 10.1016/j.canlet.2009.02.020
- Wang, Y., Waters, J., Leung, M. L., Unruh, A., Roh, W., Shi, X., . . . Navin, N. E. (2014). Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature*, 512(7513), 155-160. doi: 10.1038/nature13600
- Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 269-270.
- Warburg, O. (1956b). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Warburg, O., Posener, K., & Negelein, E. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Zestschr*, 152, 319-344.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol*, 8, 519-530.
- Watson, N. F., Ramage, J. M., Madjd, Z., Spendlove, I., Ellis, I. O., Scholefield, J. H., & Durrant, L. G. (2006). Immunosurveillance is active in colorectal cancer as



- downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer*, 118(1), 6-10. doi: 10.1002/ijc.21303
- Webb, E. S., Liu, P., Baleeiro, R., Lemoine, N. R., Yuan, M., & Wang, Y. H. (2018). Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *J Biomed Res*, 32(5), 317-326. doi: 10.7555/jbr.31.20160168
- Weber, J. S., & Rosenberg, S. A. (1988). Modulation of murine tumor major histocompatibility antigens by cytokines in vivo and in vitro. *Cancer Res*, 48(20), 5818-5824.
- Wei, W., Gómez-Durán, A., Hudson, G., & Chinnery, P. F. (2017). Background sequence characteristics influence the occurrence and severity of disease-causing mtDNA mutations. *PLoS Genet*, 13(12), e1007126. doi: 10.1371/journal.pgen.1007126
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., . . . Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(19), 8788-8793. doi: 10.1073/pnas.1003428107
- Weinhouse, S. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 267-269.
- Whitehouse, S., Cooper, R. H., & Randle, P. J. (1974). Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids. *Biochem J*, 141(3), 761-774.
- Williams, C. M., Engler, A. J., Slone, R. D., Galante, L. L., & Schwarzbauer, J. E. (2008). Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Res*, 68(9), 3185-3192. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-2673
- Wong, J. Y., Huggins, G. S., Debidda, M., Munshi, N. C., & De Vivo, I. (2008). Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol*, 109(3), 394-402. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.01.038
- Woo, S. R., Corrales, L., & Gajewski, T. F. (2015). Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol*, 33, 445-474. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112043
- Wu, J., Hu, L., Wu, F., Zou, L., & He, T. (2017). Poor prognosis of hexokinase 2 overexpression in solid tumors of digestive system: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(19), 32332-32344. doi: 10.18632/oncotarget.15974

- Xia, H., Nho, R. S., Kahm, J., Kleidon, J., & Henke, C. A. (2004). Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem*, 279(31), 33024-33034. doi: 10.1074/jbc.M313265200
- Yang, J. C., & Rosenberg, S. A. (2016). Adoptive T-Cell Therapy for Cancer. *Adv Immunol*, 130, 279-294. doi: 10.1016/bs.ai.2015.12.006
- Yang, M., Soga, T., & Pollard, P. J. (2013). Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer. *J Clin Invest*, 123(9), 3652-3658. doi: 10.1172/jci67228
- Yang, Y. A., Han, W. F., Morin, P. J., Chrest, F. J., & Pizer, E. S. (2002). Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp Cell Res*, 279(1), 80-90.
- Yao, D., Dai, C., & Peng, S. (2011). Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res*, 9(12), 1608-1620. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-10-0568
- Yuan, Y., Wang, W., Li, H., Yu, Y., Tao, J., Huang, S., & Zeng, Z. (2015). Nonsense and missense mutation of mitochondrial ND6 gene promotes cell migration and invasion in human lung adenocarcinoma. *BMC Cancer*, 15, 346. doi: 10.1186/s12885-015-1349-z
- Yuneva, M. O., Fan, T. W., Allen, T. D., Higashi, R. M., Ferraris, D. V., Tsukamoto, T., . . . Bishop, J. M. (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab*, 15(2), 157-170. doi: 10.1016/j.cmet.2011.12.015
- Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., & Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 183(4), 1533-1544.
- Zhang, H., & Chen, J. (2018). Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J Cancer*, 9(10), 1773-1781. doi: 10.7150/jca.24577
- Zhang, H. H., & Guo, X. L. (2016). Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer Chemother Pharmacol*, 78(1), 13-26. doi: 10.1007/s00280-016-3037-3

- Zhang, J., Gao, Q., Zhou, Y., Dier, U., Hempel, N., & Hochwald, S. N. (2015). Focal adhesion kinase-promoted tumor glucose metabolism is associated with a shift of mitochondrial respiration to glycolysis. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2015.256
- Zhou, S., Kachhap, S., Sun, W., Wu, G., Chuang, A., Poeta, L., . . . Califano, J. A. (2007). Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(18), 7540-7545. doi: 10.1073/pnas.0610818104
- Zimna, A., & Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int*, 2015, 549412. doi: 10.1155/2015/549412
- Zinovkina, L. A. (2018). Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. *Biochemistry (Mosc)*, 83(3), 233-249. doi: 10.1134/s0006297918030045



